Srinagarind Med J 1995; 10(3) 113-123

การตรวจหาแอนติ-เอสเอ็มและแอนติ-อาร์เอ็นพี ด้วยวิธีการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง กับวิธีเคาน์เตอร์อิมมูโนอิเลคโตโฟรีซิส

มยุนา ศรีสุภนันต์ Ph.D.*
กนกรัตน์ นันทิรุจ พ.บ.**
พองผกา สาดี วท.บ.*

* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Anti-Sm and Anti-RNP Detection by Passive Hemagglutination and Counter Immunoelectrophoresis

Mayuna Srisuphanunt Ph.D.*
Kanokrat Nantiruj M.D.**
Puangpaka Sadee B.Sc.*

* Department of Clinical Immunology Faculty of Associated Medical Science
** Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Abstract

A comparison study of anti-Sm and anti-RNP detection between Passive hemagglutination (PHA) and Counter immunoelectrophoresis (CIE) in 92 autoimmune disease sera, included 52 sera from patient with SLE, 18 sera from patient with MCTD and 22 sera from patients with other diseases. The methodology of this study was blind assesed through out the studies. The results of PHA detection showed that Patients with SLE 17 cases were positive for anti-Sm, 10 cases were both positive for anti-Sm and anti-RNP and 25 cases were negative. Patients with MCTD 14 cases were positive for anti-RNP and 4 cases were negative whereas the other disease patients were all negative. The results of CIE detection in the same patient groups were found that patients with SLE 34 cases were positive for anti-Sm, 6 cases were both positive for anti-Sm and anti-RNP and 12 cases were negative. Patients with MCTD 15 cases were positive for anti-RNP and 3 cases were negative whereas the other disease patients 20 cases were negative and only 2 cases were positive for anti-RNP.

Consideration in the detection of anti-Sm and anti-RNP by CIE were more sensitive than PHA in both groups of patients with SLE (76.92% and 51.92%; respectively) and MCTD (83.33% and 77.78%; respectively). More over the detection by CIE and PHA gave no difference in specificity in both groups of patients with SLE (100% equaly for two methods) and MCTD (97.30% and 100%; respectively). The correlation between these two methods were good agreement with statistical significance in both groups of patients with SLE ($k=0.6296; p<0.001$) and MCTD ($k=0.7299; p<0.001$).

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหา anti-Sm และ Anti-RNP ด้วยวิธี Passive hemagglutinaiton (PHA) และวิธี Counter immunoelectrphoresis (CIE) ของซีรั่มผู้ป่วยด้วยโรคออโตอิมมูน จำนวน 92 ราย เป็นผู้ป่วย SLE จำนวน 52 ราย ผู้ป่วย MCTD จำนวน 18 ราย และผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ จำนวน 22 ราย ด้วยการประเมินผลแบบผู้ทำการทดสอบไม่ทราบโรคของผู้ป่วยมาก่อน (Blind assesment) ผลการศึกษาพบว่าการทดสอบด้วยวิธี PHA ในกลุ่มผู้ป่วย SLE ให้ผลบวก anti-Sm จำนวน 17 ราย ผลบวก anti-Sm ร่วมกับ anti-RNP จำนวน 10 ราย และไม่พบผลบวกจำนวน 25 ราย ในกลุ่มผู้ป่วย MCTD ให้ผลบวก anti-RNP เพียงชนิดเดียว จำนวน 14 ราย และไม่พบผลบวกจำนวน 4 ราย ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ ไม่พบผลบวกต่อการทดสอบเลย ส่วนการทดสอบด้วยวิธี CIE ในผู้ป่วยกลุ่มเดียวกัน พบว่าในกลุ่มผู้ป่วย SLE ให้ผลบวก anti-Sm จำนวน 34 ราย ผลบวก anti-Sm ร่วมกับ anti-RNP จำนวน 6 ราย และไม่พบผลบวก จำนวน 12 ราย ในกลุ่มผู้ป่วย MCTD ให้ผลบวก anti-RNP เพียงชนิดเดียว จำนวน 15 ราย และไม่พบผลบวกจำนวน 3 ราย ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ ไม่พบผลบวกจำนวน 20 ราย มีเพียง 2 ราย เท่านั้นที่จะให้ผลบวก anti-RNP

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการทดสอบด้วยวิธี CIE จะมีความไวมากกว่าวิธี PHA ทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE (ร้อยละ 76.92 และ 51.92 ตามลำดับ) และผู้ป่วย MCTD (ร้อยละ 83.33 และ 77.78 ตามลำดับ) ส่วนความจำเพาะของทั้งสองวิธีอยู่ในอัตราใกล้เคียงกัน ทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE (ร้อยละ 100 เท่ากันในสองวิธี) และผู้ป่วย MCTD (ร้อยละ 97.30 และ 100 ตามลำดับ) และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีพบว่า มีความสัมพันธ์ที่ดีต่อกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE ($k=0.6296$; $p<0.001$) และผู้ป่วย MCTD ($k=0.7299$;$p<0.001$).

บทนำ

โรคต้านเนื้อเยื่อตนเอง (Autoimmune disease) เป็นกลุ่มโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย [1,6] โรคต้านเนื้อเยื่อตนเองที่มีความสำคัญและพบมากในปัจจุบัน ได้แก่ โรค SLE (Systemic lupus erythematosus) และโรค MCTD (Mixed connective tissue disease) ซึ่งในการวินิจฉัยแต่ละโรคต้องอาศัยอาการทางคลินิกและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการประกอบกัน[2] SLE เป็นโรคของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่ยังไม่เป็นที่ทราบสาเหตุแน่นอนอยู่ในกลุ่มโรค Non-organ specific autoimmune disease มักเป็นในหญิงสาวอายุราว 17-39 ปี[1] โดยพบในหญิงมากกว่าในชายถึง 7-9 เท่า[3] และเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหลายระบบของร่างกาย แต่ที่พบบ่อยคือเป็นตามผิวหนัง ข้อ และที่ไต ในการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นโรค SLE ต้องมีการตรวจพบทางคลินิกและห้องปฏิบัติการ โดยวิธีธรรมดาไม่ต่ำกว่า 4 ใน 11 ข้อ ตามที่สมาคมแพทย์ไขข้ออเมริกัน (American Rheumatism Association; ARA) ได้กำหนดไว้[13] นอกจากนี้ การตรวจพบ Antinuclear antibody (ANA) ในซีรั่มเป็นข้อกำหนดที่สำคัญอันหนึ่งที่ใช้ในการประกอบการวินิจฉัย ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ANA สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วย SLE ถึงร้อยละ 90-95 ในจำนวนนี้พบ anti-Sm ประมาณร้อยละ 30-40 ของผู้ป่วย SLE[15] MCTD เป็นโรคของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอีกโรคหนึ่ง พบในหญิงอายุราว 30-60 ปี ผู้ป่วยจะมีลักษณะอาการคลินิกของ SLE, DM (Dermatomyositis) และ PSS (Progressive systemic sclerosis) ร่วมกัน แต่แยกด้วยลักษณะเฉพาะของโรคคือมี high titer ของ anti-RNP (พบร้อยละ 95-100 ของผู้ป่วย MCTD) และไม่พบ anti-Sm เลย[12] ตรวจ ANA โดยวิธี indirect Immunofluorescence มักจะพบ speckle pattern และเกี่ยวข้องกับไตเพียงเล็กน้อยหรือไม่เกี่ยวข้องกับไตเลย[16]

การตรวจ anti-Sm และ anti-RNP ในห้องปฏิบัติการทำได้หลายวิธี วิธีเริ่มแรกและนิยมทำกันมากคือ Quchterlony immunodiffusion (ID) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำง่าย แต่การอ่านผลค่อนข้างลำบาก และใช้เวลารอผลนาน ต่อมาได้พัฒนาเทคนิค Counter immunoelectrophoresis (CIE) เพื่อย่นระยะเวลาของปฏิกิริยาและเพิ่มความไวของการทดสอบแต่ต้องใช้เครื่องอุปกรณ์อิเลคโตรโฟริซิส ซึ่งมีราคาแพงและยังไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

ในปี 1977 EM.TAN และคณะ[17] ได้ศึกษาวิธี Passive hemagglutination (PHA) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงกึ่งปริมาณ (semiquantitative) ได้ [15] และอ่านแปลผลได้ง่าย ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการใช้เทคโนโลยีชั้นสูงในการเตรียมแอนติเจน (Genetic engineering) เพื่อใช้ในการตรวจ anti-Sm และ anti-RNP นั้น[10] แต่เทคนิคดังกล่าวต้องใช้งบประมาณค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ซึ่งไม่เหมาะกับงานประจำ (Routine laboratory) และประเทศที่กำลังพัฒนาอย่างประเทศไทย

ปัจจุบันในห้องปฏิบัติการทางภูมิคุ้มกันวิทยาโดยทั่วไป รวมทั้งที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ใช้เทคนิค CIE ในการตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เป็นน้ำยาสำเร็จรูป (Commercial reagent kit) จากผลิตภัณฑ์ต่างประเทศ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะให้ผลการตรวจที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง วิธีการใช้สะดวก รวดเร็ว แต่น้ำยาที่สั่งซื้อมาราคาค่อนข้างแพง และไม่สามารถวิเคราะห์หาระดับแอนติบอดีได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ระหว่างวิธี CIE กับวิธี PHA เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจลง เนื่องจากวิธี PHA นี้เป็นวิธีที่สามารถเตรียมน้ำยาขึ้นได้เอง และได้ผลการตรวจที่เชื่อถือได้ในระดับหนึ่ง[17] อย่างไรก็ตามเพื่อประกันคุณภาพของการตรวจวัด (Quality assurance) จึงต้องศึกษาถึงความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีและปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบก่อน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

เป็นการเก็บตัวอย่างซีรั่มโดยการเจาะเลือดผู้ป่วยด้วยโรคออโตอิมมูน ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จำนวน 92 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วย SLE จำนวน 52 ราย ผู้ป่วย MCTD จำนวน 18 ราย และผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ จำนวน 22 ราย การวินิจฉัยแยกโรคแต่ละชนิดของผู้ป่วยนั้นทำโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านโรครูมาติค และได้บันทึกลงในประวัติผู้ป่วย ซีรั่มตัวอย่างควบคุมใช้คนปกติได้มาจากผู้บริจาคโลหิตที่คลังเลือดกลางโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จำนวน 100 ราย โดยเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติอาการทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับโรครูมาติค และมีผลการตรวจเลือดเป็นลบต่อ HIV Ag, Anti-HIV, HBs-Ag, Anti-HBs, anti-HBc และ VDRL สำหรับซีรั่มตัวอย่างของกลุ่มคนปกตินี้ใช้สำหรับหาค่าระดับปกติ (cut-off titer) ของการทดสอบด้วยวิธี PHA สิ่งส่งตรวจทุกรายจะแบ่งใส่หลอดเล็ก ๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ. พร้อมกำกับหมายเลขไว้

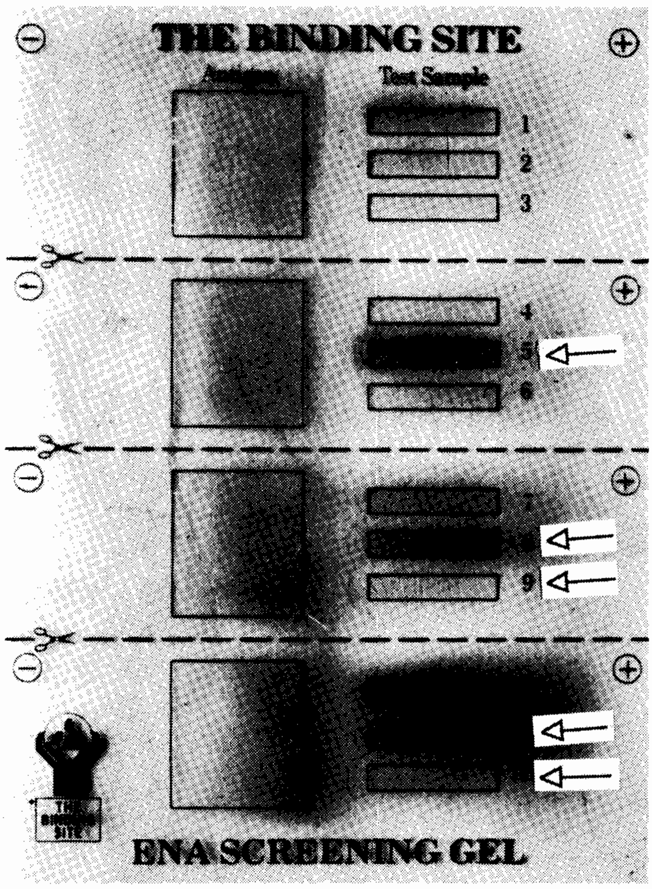
2. วิธีการ

แบ่งการทดสอบเป็น 2 ส่วน โดยผู้ทำการทดสอบไม่ทราบชนิดโรคของผู้ป่วยมาก่อน (Blind assesment) คือ

2.1 การตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี CIE โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป (Commercial kit) ของผลิตภัณฑ์ Binding site ประเทศอังกฤษ ซึ่งอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของประจุของโปรตีน ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีไปยังขั้วที่มีประจุตรงข้าม ซึ่งแอนติเจน ENA extract (หรือ Sm/U1RNP antigen) จะวิ่งไปยังขั้วบวก และแอนติบอดีจำเพาะในซีรั่มจะวิ่งไปยังขั้วลบ ที่ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีเหมาะสมจะเกิดตะกอน precipitin line ขึ้น แบ่งวิธีทำเป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกทำ ENA screening ก่อน ซีรั่มผู้ป่วยรายที่ให้ผลบวกกับ ENA screening จึงนำมาทำ typing ต่อในขั้นตอนที่ 2 เพื่อแยกชนิดแอนติเจน Sm และ U1RNP

2.2 การตรวจ anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี PHA โดยใช้น้ำยาที่เตรียมขึ้นเอง ซึ่งมีหลักการใช้เม็ดเลือดแดงแกะ (sheep red blood cell; SRBC) ที่เคลือบด้วย Rabit Thymus Extract (RTE) ซึ่งประกอบด้วยแอนติเจน Sm และแอนติเจน RNP ทำปฏิกิริยากับ anti-Sm และ/หรือ anti-RNP ในซีรั่มตัวอย่างทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ส่วน RTE coated SRBC ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ RNase ซึ่งจำเพาะกับแอนติเจน RNP จะทำปฏิกิริยากับ anti-Sm ในซีรั่มเท่านั้น ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ดังนั้นเมื่อทำการทดสอบใน microtiter plate ซีรั่มที่มี anti-Sm จะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแกะทั้งแถว ส่วนซีรั่มที่มี anti-RNP จะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแกะเฉพาะแถวแรกเท่านั้น

รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจ anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี CIE ขั้นตอน screening



positive

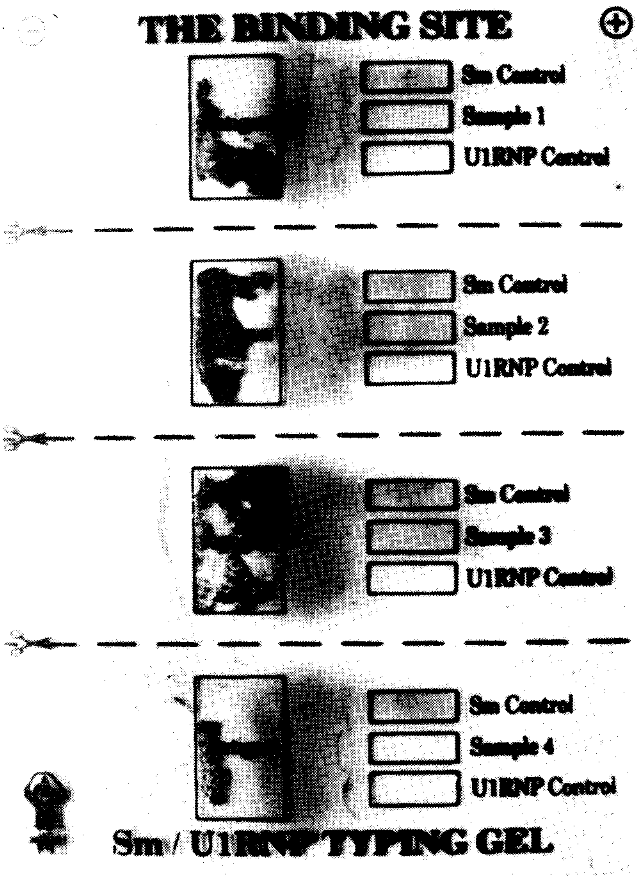
positive

positive

negative control

positive control

รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจ anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี CIE ขั้นตอน typing



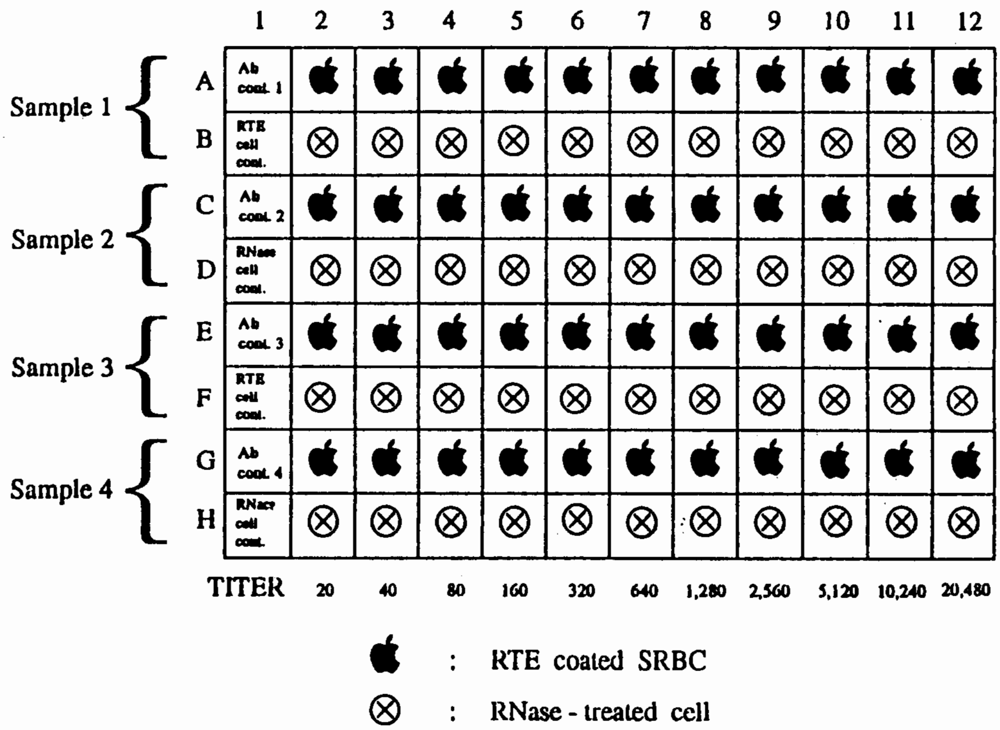
Sample 1
anti-Sm positive

Sample 2
negative

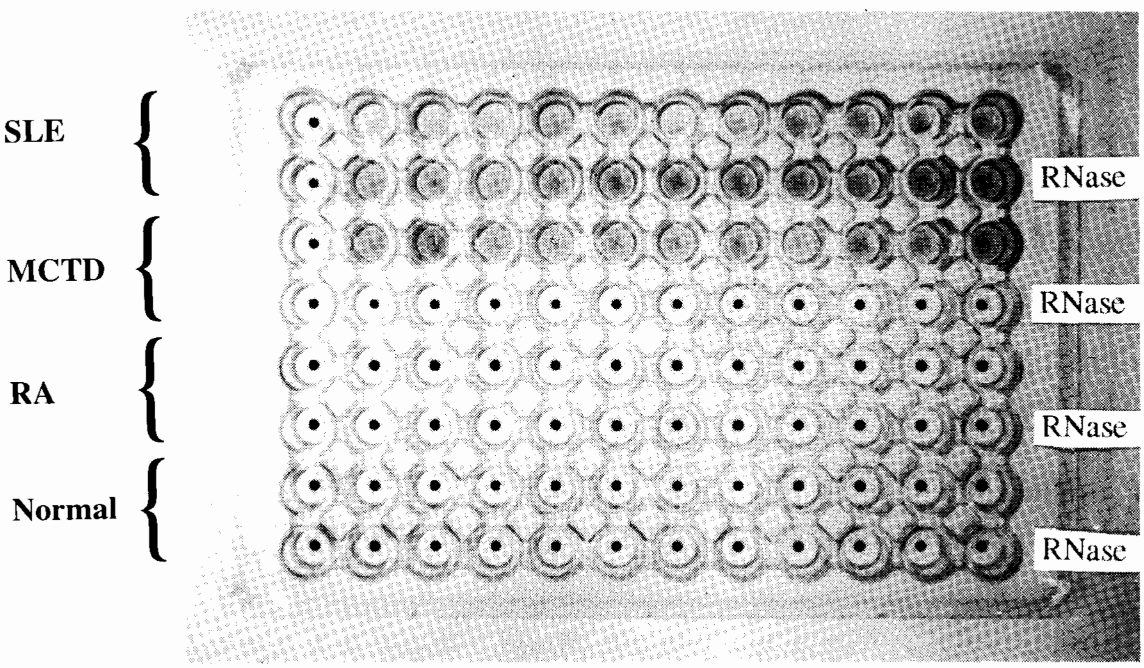
Sample 3
negative

Sample 4
anti-RNP positive

รูปที่ 3 แสดงวิธีการทดลองด้วยวิธี PHA



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจ anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี PHA



ผล

การตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี CIE

การตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี CIE ในซีรั่มผู้ป่วยด้วยโรคออโตอิมมูน จำนวน 92 ราย เป็นผู้ป่วย SLE จำนวน 52 ราย ผู้ป่วย MCTD จำนวน 18 ราย และผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ จำนวน 22 ราย ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มผู้ป่วย SLE ให้ผลบวก anti-Sm จำนวน 34 ราย ให้ผลบวกต่อ anti-Sm ร่วมกับ anti-RNP จำนวน 6 ราย และไม่พบผลบวก จำนวน 12 ราย ในกลุ่มผู้ป่วย MCTD ให้ผลบวก anti-RNP เพียงชนิดเดียว จำนวน 15 ราย และไม่พบผลบวก จำนวน 3 ราย ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ ไม่พบผลบวก จำนวน 20 ราย มีเพียง 2 รายเท่านั้นที่ให้ผลบวก anti-RNP (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี CIE

ชนิดของ antibody / โรค	วิธี CIE			
	anti-Sm	**anti-RNP**	**anti-Sm และ anti-RNP**	**Negative**
SLE (52)	34	0	6	12
MCTD (18)	0	15	0	3
โรคออโตอิมมูนอื่น ๆ	0	2	0	20

การตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี PHA ในซีรั่มคนปกติ

การตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี PHA ในซีรั่มคนปกติ จำนวน 100 ราย เพื่อหาค่าระดับปกติ (cut-off titer) ผลการศึกษาพบว่าซีรั่มของคนปกติ จำนวน 98 ราย ไม่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ มีเพียงจำนวน 2 ราย ที่ให้ผลบวกทั้ง anti-Sm และ anti-RNP ที่ระดับความเจือจางเท่ากับ 1:4 จากการทดลองนี้สามารถหาค่าระดับปกติโดยใช้หลักการทางสถิติ [4,7] พบว่าค่าระดับปกติสำหรับ anti-Sm และ anti-RNP มีค่าเท่ากันที่ระดับความเจือจางเท่ากับ 1:80

การตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี PHA ในซีรั่มผู้ป่วย

การตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี PHA ในซีรั่มผู้ป่วยทั้งหมด จำนวน 92 ราย (ซีรั่มกลุ่มเดียวกับที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี CIE) ซึ่งแบ่งเป็น SLE จำนวน 52 ราย ผู้ป่วย MCTD จำนวน 18 ราย และผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ จำนวน 22 ราย ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มผู้ป่วย SLE ให้ผลบวก anti-Sm จำนวน 17 ราย ให้ผลบวก anti-Sm ร่วมกับ anti-RNP จำนวน 10 ราย และไม่พบผลบวก จำนวน 25 ราย ในกลุ่ม MCTD ให้ผลบวก anti-RNP เพียงชนิดเดียว จำนวน 14 ราย และไม่พบผลบวก จำนวน 4 ราย ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ ไม่พบผลบวกต่อการทดสอบเลย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี PHA

ชนิดของ antibody / โรค	วิธี PHA			
	anti-Sm	**anti-RNP**	**anti-Sm และ anti-RNP**	**Negative**
SLE (52)	17	0	10	25
MCTD (18)	0	14	0	4
โรคออโตอิมมูนอื่น ๆ	0	2	0	22

การศึกษาเปรียบเทียบ sensitivity, specificity และ Positive predictive value (PPV)

จากการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ด้วยวิธี PHA กับวิธี CIE (ตารางที่ 3) ผลการศึกษาพบว่า การทดสอบด้วยวิธี CIE จะมีความไวมากกว่าวิธี PHA ทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE โดยมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 76.92 และ 51.92 ตามลำดับ และในกลุ่มผู้ป่วย MCTD โดยมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 83.33 และ 77.78 ตามลำดับ ส่วนความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวกของทั้งสองวิธีอยู่ในอัตราที่ใกล้เคียงกันทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE โดยมีความจำเพาะ (specificity) ของวิธี CLE และวิธี PHA ร้อยละ 100 เท่ากันในสองวิธี ค่าการทำนายผลบวก (PPV) ร้อยละ 100 เท่ากันในสองวิธี และในกลุ่มผู้ป่วย MCTD โดยมีความจำเพาะของวิธี CIE และวิธี PHA ร้อยละ 97.30 และ 100 ตามลำดับ ค่าการทำนายผลบวก (PPV) ร้อยละ 88.24 และ 100 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธี PHA กับ CIE

	CIE		**PHA**	
	SLE	**MCTD**	**SLE**	**MCTD**
Sensitivity	76.92	83.33	51.92	77.78
Specificity	100	97.30	100	100
PPV	100	88.24	100	100

การศึกษาความสัมพันธ์ของผลการตรวจ anti-Sm และ anti-RNP

จากการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการทดสอบ ทั้งวิธี CIE และวิธี PHA โดยใช้หลักการของ Kappa analysis คือ นำผลการทดสอบของทั้งสองวิธีมาคำนวณหาค่า k ตามสูตรทางสถิติ (4,7) แล้วนำค่า k ที่ได้ไปสรุปเป็นระดับความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธี ดังนี้

$k < 0.4$ หมายถึง มีความสัมพันธ์ที่ไม่ดีต่อกัน หรือไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน (poor agreement)

$0.40 \le k \le 0.75$ หมายถึง มีความสัมพันธ์ที่ดีต่อกัน (good agreement)

$k > 0.75$ หมายถึง มีความสัมพันธ์ที่ดีเยี่ยมต่อกัน (excellent agreement)

จากผลการศึกษาและคำนวณค่า k พบว่าการทดสอบทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์ที่ดีต่อกันอย่างมีนัยสำคัญ (good agreement) ทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE ($k = 0.6296$; $p<0.001$) และผู้ป่วย MCTD ($k = 0.7299$; $P<0.001$)

วิเคราะห์สรุป

การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบการตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ระหว่างวิธี CIE กับวิธี PHA ในซีรั่มผู้ป่วยด้วยโรคออโตอิมมูน จำนวน 92 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วย SLE จำนวน 52 ราย ผู้ป่วย MCTD จำนวน 18 ราย และผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่นๆ จำนวน 22 ราย ผู้ป่วยเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น การวินิจฉัยแยกโรคและคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยทำโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านโรครูมาติค

การตรวจหา anti-Sm และ anti-RNP ที่เคยมีผู้ศึกษาในต่างประเทศ พบว่าวิธี Immunoblotting ถือเป็นวิธีที่ใช้อ้างอิงกัน เพราะมีความจำเพาะสูงและสามารถตรวจในเชิงปริมาณได้[6] แต่เป็นวิธีที่มีความยุ่งยากจึงเหมาะที่จะใช้งานวิจัยมากกว่าที่จะใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการ[9] สำหรับวิธี CIE ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจถูกต้อง แม่นยำและมีความไวสูง โดยพบว่ามีความไวมากกว่าวิธี Immunodiffusion ถึง 20 เท่า[5,12] นอกจากนี้ยังมีวิธีการใช้สะดวก รวดเร็ว และสามารถตรวจควบคุมคุณภาพได้ง่าย อย่างไรก็ตามวิธี CIE ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์หาระดับแอนติบอดีได้ และราคาค่อนข้างแพง คณะวิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีนี้กับวิธี PHA ของ EM. Tan และคณะ[17] เนื่องจากวิธี PHA เป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาระดับแอนติบอดีในเชิงกึ่งปริมาณได้ และสามารถเตรียมน้ำยาขึ้นได้เอง จึงเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจลง

จากผลการศึกษานี้พบว่าวิธี CIE มีความไว (sensitivity) ในการทดสอบมากกว่าวิธี PHA ทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE โดยมีความไวร้อยละ 76.92 และ 51.92 ตามลำดับ และกลุ่มผู้ป่วย MCTD โดยมีความไวร้อยละ 83.33 และ 77.78 ตามลำดับ เนื่องจากวิธี PHA มีหลายขั้นตอนที่มีผลต่อความไวของการทดสอบตามรายงานของ Stavitsky[19] พบว่าหากใช้เม็ดเลือดแดงแกะในปริมาณความเข้มข้นที่สูงเกินไปในการเคลือบแอนติเจนจะมีผลไปลดความไวของการทดสอบ ส่วนผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของการทดสอบพบว่าความจำเพาะของวิธี CIE กับวิธี PHA อยู่ในอัตราที่ใกล้เคียงกันทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE โดยมีความจำเพาะร้อยละ 100 เท่ากัน ทั้งในสองวิธีและกลุ่มผู้ป่วย MCTD โดยมีความจำเพาะร้อยละ 97.00 และ 100 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษาได้คัดเลือกโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านโรครูมาติคและระบุยืนยันแน่ชัด ทั้งในผู้ป่วย SLE และ MCTD นอกจากนี้จำนวนผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนอื่น ๆ ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมมีจำนวนน้อยเกินไปทำให้โอกาสที่จะพบผลบวกปลอมลดลง จึงทำให้ผลการศึกษานี้มีความจำเพาะสูง เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานต่างประเทศในด้านความไวของการทดสอบ พบว่าผลการศึกษานี้มีความไวสูงกว่า[8,9,12,20] ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของวิธีการทดสอบ หรือลักษณะทางคลินิกของโรคในผู้ป่วยไทยแตกต่างจากชาวต่างประเทศ ความแตกต่างทางพันธุกรรม และ/หรือ ความแตกต่างในภาวะเศรษฐกิจ ความเป็นอยู่ ตลอดจนการบริการด้านสาธารณสุข

จากการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีโดยใช้หลักการของ Kappa analysis[4,7] พบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์ที่ดีต่อกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในกลุ่มผู้ป่วย SLE ($K=0.6296$; $p<0.001$) และผู้ป่วย MCTD ($k=0.7299$; $p<0.001$) อย่างไรก็ตามระดับความสัมพันธ์นี้ยังไม่อาจยืนยันประกันคุณภาพการนำวิธี PHA มาใช้แทนวิธี CIE ในงานบริการคลินิกได้เลยทีเดียว เนื่องจากซีรั่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้รับการวินิจฉัยแยกโรคและคัดเลือกจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านโรครูมาติคตามที่กล่าวแล้ว ดังนั้นความผิดพลาดจากซีรั่มตัวอย่างมีค่อนข้างน้อย ความผิดพลาดส่วนใหญ่น่าจะมาจากความผิดพลาดของวิธีทดสอบ ซึ่งควรมีการพัฒนาวิธี PHA ให้มีระดับความสัมพันธ์กับวิธี CIE มากกว่านี้ คืออยู่ในระดับความสัมพันธ์ที่ดีเยี่ยมต่อกัน (excellent agreement; $k>0.75$) จึงจะยอมรับวิธี PHA ให้นำมาใช้แทนวิธี CIE ได้ การพัฒนาวิธี PHA ในโอกาสต่อไปนั้นควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเม็ดเลือดแดงแกะ ในขั้นตอนการเคลือบแอนติเจน [19] การปนเปื้อนของแอนติเจนชนิดอื่น ในขั้นตอนการเตรียมเซลล์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งหนึ่ง พบว่าใน Rabbit thymus extract (RTE) อาจมีแอนติเจนชนิดอื่นปะปนมานอกเหนือจากแอนติเจน Sm และ RNP เช่น SS-B/La, Scl-70, Jo-1 เป็นต้น[11,18] นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญอื่น ๆ เช่น คุณภาพของเม็ดเลือดแดงแกะ หากเก็บไว้นานเกินไปจะทำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบบไม่จำเพาะ

(non-specific agglutination) จึงไม่ควรนำมาใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ RNase ที่ใช้ย่อยแอนติเจน RNP และ pH ของบับเฟอร์เป็นต้น

จากที่กล่าวแล้วข้างต้น จะเห็นว่าวิธี PHA มีขั้นตอนในการทำหลายขั้นตอน และมีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย จึงควรมีการพัฒนาให้มีความเหมาะสมก่อนนำไปใช้ทั้งในด้านวิธีการและประสิทธิภาพ โดยคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว หรือพัฒนาวิธีอื่นที่ให้ผลการตรวจใกล้เคียงกับวิธี CIE และเหมาะกับงานประจำทางห้องปฏิบัติการ เช่น วิธี ELISA เพื่อให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและประหยัดค่าใช้จ่ายโดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. ธาดา เปี่ยมพงศ์สานต์ และคณะ. โรคผิวหนัง เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ: สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข,2520:173-87.
2. ประพันธ์ ภานุภาค และคณะ. วิทยาภูมิคุ้มกัน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยลัย,2527: 171-7
3. เชียงใหม่, มหาวิทยาลัย. คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา.พยาธิวิทยาพื้นฐาน เล่มที่ 1. 2530.
4. ขอนแก่น, มหาวิทยาลัย. คณะสาธารณสุขศาสตร์. ภาควิชาชีวสถิติและประชากรศาสตร์, การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่องสถิติชีวภาพ จัดโดย หน่วยระบาดวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ และภาควิชาสถิติและประชากรศาสตร์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2537:156-7.
5. Anderson JD,et al. Autoimmune profile testing by immunodiffusion (ID) and Hemagglutination (HA) : Comparison with routine FANA testing: Arthritis Rheum 1991;34 (suppl.1) :8.
6. Anderson JD, et al. Immunoblot profiles of sera positive for autoantibodies to extractable nuclear antigen (ENA) : Comparison of Immunoblot Hemagglutination and Immunodiffusion assay. Arthritis Rheum 1991;34 (suppl.1) : 8.
7. University of Newcastel. Center for clinical Epidemiology and Biostatistics. STAT 402 Analysis of Categorical Data: 5 square Tables. New South Wales, 1993;5-7.
8. Deesomchok V, Tumrasuin T. Clinical study of Thai patients with systemic lupus erythematosus. J Med Ass Thai 1983;66:680.
9. Dubois EL,et. al. Lupus Erythematosus. 4 th ed. Philadelphia: Saunders, 1993:22.
10. Jonathan Brostoff, et. al. Clinical Immunology. London:Saunders,1991.
11. Josef SS, et. al. Systemic Lupus Erythematosus: Clinical and Experimental Aspects. Heidelberg : Springer-Verlag, 1987:9,106.
12. Kelly WN, et. al. Textbook of Rheumatology Vol. 1. Philadelphia : Saunders, 1981:670,1151.
13. Lanita RG. Systemic Lupus Erythematosus. 2 nd ed. New York : Churchill Livingstone, 1992:3-11
14. Lowry OH, et. al. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol, Chem. 1951; 193:265-75.
15. Nakamura RM., et. al. Antibody to ANA : advances in laboratory tests and significance in systemic rheumatic disease. 2 nd ed. American Society of Clinical Pathologist Press, 1985.
16. Nishikai M, Reichlin M. Heterogenicity of preciptitating antibody in polymyositis and dermatomyositis. Arthritis Rheum 1980; 23 : 881-8.
17. Rose NR, et. al. Manual of clinical laboratory immunology. 2 nd ed. Washington DC : American Society for Microbiology, 1997 : 866-70.
18. Rose NR, et. al. Manual of clinical laboratory immunology. 4 th ed. Washington DC : American Society for Microbiology, 1987 :744.

19. Stavisky AB. Micromethods for study of proteins and antibodies : 1. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination inhibition reactions with tannic acid and protein-treated RBCs. J Immunol 1972: 360.
20. Talal N. Sex hormones and modulation of immune response in SLE. Clin Rheum. Dis. 1982;8:23.
21. Tan EM, et. al. Reference sera for antinuclear antibodies. Arthritis Rheum 1982;25:1271-7.