

การประเมินเปรียบเทียบการตรวจหาแอนตินิวเคลียร์แอนติบอดีโดยวิธี immunoperoxidase staining และ immunofluorescence assay

วิชเนต วังเสนา^{1*}, มยุรี จันทรโก²

Received: September 19, 2012

Revised & Accepted: December 4, 2012

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะประเมินวิธีการตรวจ antinuclear antibodies (ANA) โดยวิธี immunoperoxidase staining (IP) เปรียบเทียบกับวิธี indirect immunofluorescence assay (IFA) โดยทำการตรวจในซีรัมผู้ป่วย 164 ราย ซึ่งเป็นซีรัมที่ให้ผลการตรวจโดยวิธี IFA เป็นบวก 64 ราย และผลลบ 100 รายพบว่าวิธี IP ให้ค่าความไวร้อยละ 98.44 ความจำเพาะร้อยละ 99.00 และความถูกต้องของการทดสอบร้อยละ 98.78 นอกจากนี้ยังพบว่าระดับไตเตอร์มีความสัมพันธ์กันของสองวิธีอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และมีขนาดความสัมพันธ์สูง ($\text{gamma} = 0.995$) อีกทั้งรูปแบบการติดสีไม่แตกต่างกัน ($P = 1.000$) จึงสรุปได้ว่าวิธี IP สามารถใช้ตรวจ ANA แทนการตรวจโดยวิธี IFA ได้

คำสำคัญ: ANA, แอนตินิวเคลียร์แอนติบอดี, อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์, อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

²กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ จ.เพชรบูรณ์ 67000

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Comparative evaluation of antinuclear antibody testing by immunoperoxidase staining and immunofluorescence assay

Wachanan Wongsena^{1*}, Mayuree Chantho²

Abstract

This study aimed to evaluate the method to detect antinuclear antibodies (ANA) by immunoperoxidase staining (IP) comparing with indirect immunofluorescence assays (IFA). A total 164 patient sera composed of 64 positive cases and 100 negative cases by IFA. IP showed 98.44 % sensitivity, 99.00 % specificity and 98.78 % accuracy comparing with IFA. The antibodies titer had high correlation between both methods ($P < 0.001$, gamma = 0.995). In addition, the staining patterns were also not different ($P = 1.000$). Therefore, IP had capacity to replace IFA for ANA detection.

Keywords: ANA, Antinuclear antibody, Immunofluorescence assay, Immunoperoxidase staining

¹Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

²Department of Clinical Pathology, Phetchabun Hospital, Phetchabun, Thailand

* Corresponding author: (e-mail: wachananw@nu.ac.th)

บทนำ

Antinuclear antibodies (ANA) เป็นแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในนิวเคลียสหลายชนิดทั้งกรดนิวคลีอิก โปรตีน และสารประกอบของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนโดยไม่มีความจำเพาะกับอวัยวะหรือสปีชีส์โดย ANA สามารถตรวจพบได้ในซีรัมผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเองหลายโรคได้แก่ systemic lupus erythematosus (SLE), drug-induced erythematosus, mixed connective tissue diseases, rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, scleroderma, polymyositis และ dermatomyositis เป็นต้น⁽¹⁾ โดยในแต่ละโรคจะให้อัตราของผลบวกที่แตกต่างกันและความจำเพาะต่อแอนติเจนที่แตกต่างกัน

โรคภูมิคุ้มกันตนเองเป็นโรคที่มีความชุกมากเป็นอันดับสามในประเทศอเมริกา รองจากโรคมะเร็งและโรคหัวใจ โดยพบความชุกในประชากรประมาณร้อยละ 5-8 และในจำนวนนี้ร้อยละ 78 เป็นผู้หญิง⁽²⁾ SLE จัดเป็นโรคที่มีภูมิคุ้มกันตนเองชนิดหนึ่ง พบความชุกของโรคทั่วโลกอยู่ระหว่าง 17-48 คนต่อประชากรแสนคน⁽³⁾ ANA เป็นเกณฑ์หนึ่งที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคนี้^(4, 5) โดยที่ร้อยละ 96.2 ของผู้ป่วยจะให้ผลบวก⁽⁶⁾ จึงนำมาใช้ตรวจคัดกรองโรคนี้ นอกจากนี้ระดับของ ANA ยังมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค⁽⁷⁾ จึงใช้ช่วยติดตามการดำเนินของโรคและการรักษา

วิธีมาตรฐานในการตรวจ ANA คือ indirect immunofluorescence assay (IFA)⁽⁸⁾ โดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหรือจากชิ้นเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นแอนติเจนสับเสตรเพื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจากซีรัมผู้ป่วยจากนั้นจึงใช้ Fluorescein-conjugated anti-human IgG ตรวจติดตามปฏิกิริยา ซึ่งรูปแบบของการติดสี (เรืองแสง) ที่เกิดจากมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างกันและมีความสำคัญในการแปลผลต่อความจำเพาะของแต่ละโรค อย่างไรก็ตาม ANA สามารถตรวจพบได้ในคนปกติโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้สูงอายุ⁽⁹⁾ ดังนั้นในการรายงานผลจึงต้องรายงานทั้งรูปแบบการติดสีและระดับไตเตอร์ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผลแม้ว่าปัจจุบันจะมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจ ANA โดยวิธี ELISA เป็นน่ายำล้าเรื่อรูปจากหลายบริษัทเพื่อความสะดวกและสามารถตรวจโดยเครื่องอัตโนมัติได้ แต่ผลการทดสอบในซีรัมผู้ป่วย SLE จะพบว่ามีความไวมากกว่า IFA ในขณะที่ความจำเพาะมีตั้งแต่ระดับต่ำถึงสูง⁽¹⁰⁾ อีกทั้งเมื่อให้ผลบวกต้องตรวจแยกชนิดแอนติบอดีที่จำเพาะทำให้

เสียเวลาและค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้มีการพัฒนาการตรวจด้วยเทคนิค multiplexed bead-based immunoassays ซึ่งใช้แอนติเจนจำเพาะเคลือบ bead ที่เรืองแสงต่างกัน และตรวจวัดโดยหลักการ flow cytometry ทำให้สามารถทราบความจำเพาะของแอนติบอดีได้ในการตรวจเพียงครั้งเดียวและพบว่าเทคนิคนี้มีความไวและความจำเพาะสูง⁽¹¹⁾ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงและเครื่องมือที่จำเพาะอีกทั้งชนิดของแอนติเจนที่นำมาเคลือบมีจำนวนจำกัดเช่นเดียวกับวิธี line immunoassays ซึ่งตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะได้ 15 ชนิดซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวต่ำและความจำเพาะสูงจึงเหมาะสมในการใช้ตรวจยืนยันเมื่อผล IFA เป็นบวก⁽¹²⁾ แต่ถ้าใช้ตรวจคัดกรองได้ผลลบจะ rule out โรคไม่ได้ในขณะที่วิธี IFA สามารถตรวจแอนติเจนได้มากกว่า 30 ชนิด⁽¹³⁾

เนื่องจากการตรวจด้วยวิธี IFA ต้องอาศัยกล้องฟลูออเรสเซนส์ในการอ่านผล ซึ่งมีราคาแพงจึงไม่มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธีตรวจมาเป็นวิธี immunoperoxidase staining (IP) ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนแอนติบอดี และใช้ HEp-2 cell (human epithelial cell line type 2) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ มีแอนติเจนมากทำให้เห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจน และมีแอนติเจนระยะต่างๆของ mitosis หรือวัฏจักรของเซลล์⁽¹³⁾ และขึ้นเนื้อจากตับลิงเป็นแอนติเจนเช่นเดียวกับวิธี IFA แต่ใช้เอนไซม์เป็นตัวติดตามปฏิกิริยา เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับสับเสตรแล้วเกิดสีชนิดไม่ละลายน้ำขึ้นซึ่งวิธีนี้จะสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เพราะอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และยังคงสามารถอ่านรูปแบบของการติดสีได้และแปลผลได้เช่นเดียวกับการตรวจโดยวิธี IFA

วัสดุและวิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจ ณ โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ ช่วงระหว่าง 1 กันยายน 2551 ถึง 31 มกราคม 2553 และแพทย์มีการส่งตรวจ ANA การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างซีรัมซึ่งแยกเก็บภายหลังการเจาะเลือดโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำส่งตรวจโดยวิธี IFA ณ ห้องปฏิบัติการแห่งหนึ่งในกรุงเทพฯ ซึ่งตรวจโดยใช้แอนติเจนสับเสตรชนิดเดียวกับที่ใช้ในการศึกษานี้และเป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัทเดียวกัน ส่วนที่สองนำส่ง คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อใช้ในการศึกษานี้ การศึกษาครั้งนี้ได้รับการรับรอง

จากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
โครงการ 51 01 04 0008

การตรวจANA โดยวิธี immunoperoxidase staining

นำสไลด์ที่เคลือบด้วย HEp-2 cell และ primate liver (EUROIMMUN, Germany) วางไว้ ณ อุณหภูมิห้องจากนั้นหยดซีรัมที่เจือจาง 1:80 ด้วย phosphate buffered saline solution (PBS) ที่มี Tween 20 เป็นส่วนประกอบ 0.2% (PBST) 25 ไมโครลิตร ให้ซีรัมแผ่คลุมส่วนที่เคลือบเซลล์และชิ้นเนื้อ อบไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างสไลด์ 2 ครั้งด้วย PBST ครั้งละ 10 นาทีใน coplin jar จากนั้นหยด conjugate (horseradish peroxidase conjugated goat anti-human IgG (Zymed Laboratories Inc., USA) ที่เจือจางด้วย PBS 20 ไมโครลิตร อบไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นล้างสไลด์ 2 ครั้งด้วย PBST ครั้งละ 10 นาที หยด working AEC substrate (3-Amino-9-ethylcarbazole tablets; Sigma, USA) อบไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10-15 นาที ล้างสไลด์โดยฉีดให้น้ำกลั่นไหลผ่าน จากนั้น mount สไลด์ด้วย Crystal mount aqueous mounting medium (Sigma, USA) ปิดทับด้วย cover glass ดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ก่อนการทดสอบในซีรัมผู้ป่วยทั้งหมด ได้ทำการหาความเข้มข้นของ conjugate ที่เหมาะสม โดยการนำตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลตรวจ ANA เป็นบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:160 โดยวิธี IFA จำนวน 2 ราย ซึ่งมีรูปแบบผลบวกที่ต่างกันมาทดสอบโดยเจือจางซีรัมเป็น 1:80, 1:160, 1:320 และ 1:640 และไตเตรทกับ conjugate ที่เจือจางเป็น 1:2000 และ 1:4000

ในการทำการทดสอบทุกครั้งมีการทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวกและผลลบที่บรรจุมาพร้อมกับสไลด์ที่ซื้อมาจากบริษัท การตรวจในซีรัมผู้ป่วยครั้งแรกจะตรวจเฉพาะซีรัมที่เจือจาง 1:80 ถ้าให้ผลบวกก็จะทำการทดสอบกับซีรัมที่เจือจาง 1:80, 1:160, 1:320 และ 1:640 เพื่อการรายงานระดับไตเตอร์ การทำวิจัยครั้งนี้ทำการตรวจตามลำดับหมายเลขที่ได้รับจากโรงพยาบาล โดยผู้วิจัยจะไม่ทราบผล IFA จนกว่าจะวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบผล IP กับวิธีมาตรฐาน (IFA) โดยคำนวณค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy) ทดสอบความแตกต่างของรูปแบบการติดสีและความสัมพันธ์ของระดับไตเตอร์โดยวิธีตรวจทั้งสองโดยใช้สถิติไคสแควร์ กำหนดให้ค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11.5

ผลการศึกษา

1. ความเข้มข้นของ conjugate ที่เหมาะสม

จากการนำตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลตรวจ ANA เป็นบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:160 โดยวิธี IFA จำนวน 2 ราย ซึ่งมีรูปแบบผลบวกเป็น homogeneous และ nucleolar มาทดสอบที่ความเจือจางซีรัมเป็น 1:80, 1:160, 1:320 และ 1:640 ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของ conjugate เป็น 1:2000 และ 1:4000 พบว่าที่ความเข้มข้นของ conjugate เป็น 1:2000 ให้การติดสีที่ชัดเจนและระดับไตเตอร์เท่ากับวิธี IFA จึงเลือกความเข้มข้นของ conjugate เป็น 1:2000 ในการทำการทดสอบในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยทั้งหมด

2. ผลการตรวจ ANA โดยวิธี IP เปรียบเทียบกับวิธี IFA

จากตัวอย่างทั้งสิ้น 164 ราย จำนวนรายที่ให้ผลบวกและผลลบแต่ละวิธีแสดงดัง ตารางที่ 1 และ 2 เมื่อนำมาวิเคราะห์พบว่าวิธี IP มีค่าความไวร้อยละ 98.44 $[(63/64) \times 100]$ ความจำเพาะร้อยละ 99.00 $[(99/100) \times 100]$ และค่าประสิทธิภาพของการตรวจหรือความถูกต้องซึ่งคำนวณได้จากจำนวนรายที่ตรวจได้ผลบวกและผลลบตรงกับวิธีมาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 98.78 $[(63+99)/164) \times 100]$ เมื่อพิจารณาค่าระดับไตเตอร์ของผลตรวจจากสองวิธีซึ่งได้เลือกวิเคราะห์เฉพาะรายที่มีการรายงานไตเตอร์เดียว (จากการศึกษานี้มีจำนวน 5 รายที่รายงาน 2 ไตเตอร์ เนื่องจากมีการพบการติดสี 2 รูปแบบและให้ไตเตอร์ที่ต่างกัน) จำนวนทั้งสิ้น 159 ราย แสดงดัง ตารางที่ 3 พบว่ามีความสัมพันธ์กัน ($P < 0.001$) และมีความสัมพันธ์เป็นทิศทางเดียวกันและขนาดความสัมพันธ์ (gamma) เท่ากับ 0.995

ตารางที่ 1 จำนวนผลบวกและผลลบของการตรวจ ANA โดยวิธี IP และ IFA (N = 164)

IP	IFA		รวม
	ผลบวก	ผลลบ	
ผลบวก	63	1	64
ผลลบ	1	99	100
รวม	64	100	164

ตารางที่ 2 ระดับไตเตอร์ของผลการตรวจ ANA โดยวิธี IP และ IFA (N = 159)

IP titer	IFA titer						รวม
	Negative	1:80	1:160	1:320	1:640	>1:640	
Negative	99	1	0	0	0	0	100
1:80	1	14	5	0	0	0	20
1:160	0	0	6	2	0	0	8
1:320	0	0	0	4	3	0	7
1:640	0	0	0	0	7	4	11
> 1:640	0	0	0	0	1	12	13
รวม	100	15	11	6	11	16	159

ตารางที่ 3 รูปแบบของผลการตรวจ ANA โดยวิธี IP และ IFA (N = 164)

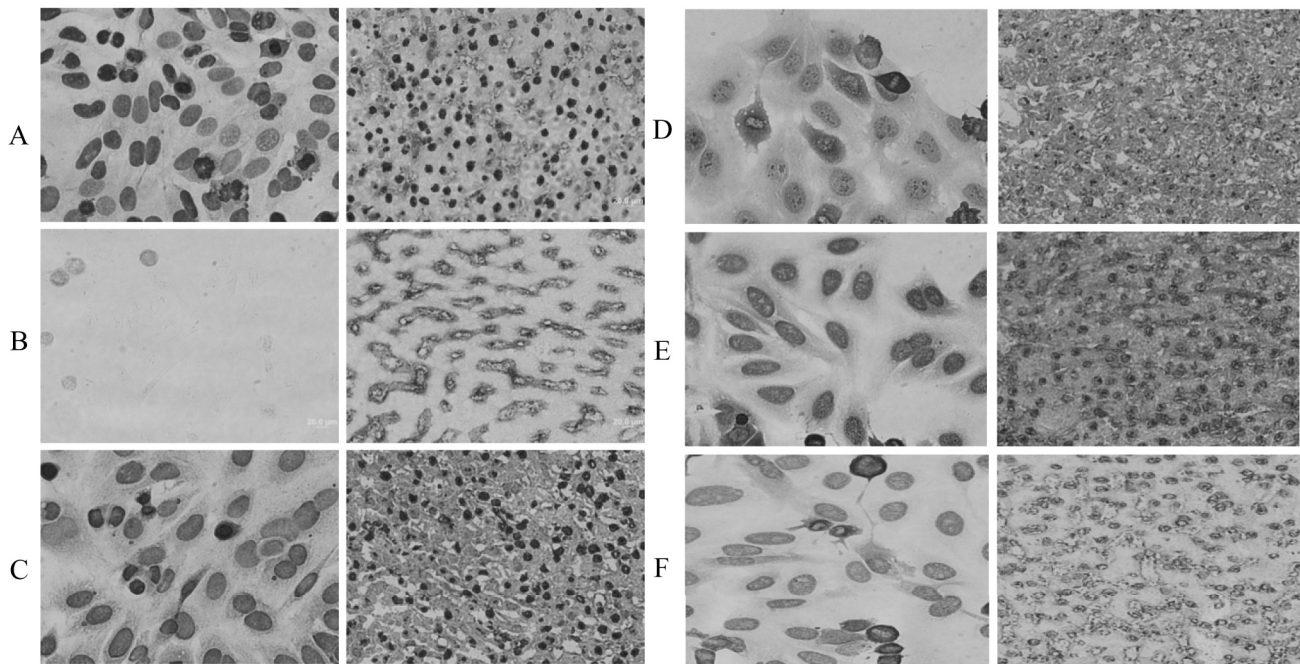
IP	IFA								รวม
	Negative	H	S	N	C	Ku	H&N	H&S	
Negative	99	0	1	0	0	0	0	0	100
H	0	13	0	0	0	0	0	0	13
S	1	1	29	0	0	0	0	0	31
N	0	0	0	6	0	0	1	0	7
C	0	0	0	0	3	0	0	0	3
Ku	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H&N	0	0	0	0	0	0	5	0	5
H&S	0	1	0	0	0	0	0	3	4
รวม	100	15	30	6	3	1	6	3	164

หมายเหตุ: H = homogeneous, S = speckle, N = nucleolar, C = centromere, Ku = anti-Ku,

H & N = homogeneous & nucleolar, H & S = homogeneous & speckle

รูปแบบการติดสีของการตรวจ ANA โดยวิธี IP พบว่ามีความชัดเจนและง่ายต่อการอ่านผลตัวอย่างแสดงดัง รูปที่ 1 โดยรูปแบบ homogeneous (รูปที่ 1A และ 1C) จะเห็นเป็นจุดสีแดงละเอียดทั่วนิวเคลียสของ HEp-2 cell ส่วนในชิ้นเนื้อ primate liver จะเห็นเป็นสีแดงที่ทั้งนิวเคลียสสายที่ให้ผลลบจะไม่พบการติดสีของนิวเคลียส (รูปที่ 1B) รูปแบบ nucleolar (รูปที่ 1D) จะเห็นเป็นสีแดงเฉพาะ

ส่วน nucleoli รูปแบบ coarse speckle (รูปที่ 1E) จะเห็นเป็นจุดสีแดงหยาดทั่วนิวเคลียสของ HEp-2 cell และ primate liver ยกเว้นส่วน nucleoli ของเซลล์ ความเข้มของการติดสีของเซลล์ทั้งสองชนิดเสมอกัน ส่วนรูปแบบ fine speckle (รูปที่ 1F) จะเห็นเป็นจุดสีแดงละเอียดทั่วนิวเคลียสของ HEp-2 cell และ primate liver แต่ความเข้มของการติดสีของ HEp-2 cell จะมากกว่า primate liver



รูปที่ 1 ตัวอย่างการติดสีของผลการตรวจ ANA โดยรูปแบบต่างๆ A) positive control; homogeneous B) negative control C) homogeneous D) nucleolar E) coarse speckle F) fine speckle (ซ้าย: HEp-2 cell, ขวา: primate liver)

การศึกษานี้พบรูปแบบ fine speckle 10 ราย และ coarse speckle 12 ราย แต่เนื่องจากผลที่รายงานจากวิธี IFA ไม่ได้แยกรายงานรูปแบบ fine speckle และ coarse speckle จึงนับรวมเป็น speckle เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบ และพบว่ารูปแบบการติดสีของการตรวจโดยวิธี IP กับวิธี IFA ไม่แตกต่างกัน ($P = 1.000$) นอกจากการติดสีนิวเคลียสแล้วยังพบรูปแบบการติดสีในส่วนของไซโตพลาสซึม ได้แก่ แอ็กทินและไลโซโซมอย่างละ 1 ราย ซึ่งไม่มีรายงานจากการส่งตรวจ IFA

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

แม้ว่าการตรวจ ANA โดยวิธี IFA จะเป็นวิธีมาตรฐาน แต่จากผลการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ซึ่งมีการเปรียบเทียบผลจากการตรวจโดยใช้ผลิตภัณฑ์จาก 5 บริษัท พบว่ามีความ

สอดคล้องกันเพียงร้อยละ 78 แม้จะใช้แอนติเจนสับสเตรทเป็น HEp-2 cell เหมือนกัน แต่จำนวน ขนาด ระยะ และคุณภาพของเซลล์อาจมีความแตกต่างกัน รวมถึงขั้นตอนการตรึงเซลล์บนสไลด์ ความคงตัวของสารฟลูออเรสเซนต์ และอายุการใช้งานของหลอดกำเนิดแสง⁽¹⁴⁾ ซึ่งยังต้องการการปรับให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน การศึกษานี้ได้พัฒนาการตรวจ ANA เป็นวิธี IP โดยใช้แอนติเจนสับสเตรทเป็น HEp-2 cell และ primate liver ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปเพื่อลดความแตกต่างจากการเตรียมเซลล์ และใช้ AEC เป็นสับสเตรทซึ่งทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำให้ได้ผลผลิตเป็นสีแดง ทำให้เห็นการติดสีได้ชัดเจน และมีความคงตัวสูง โดยการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวเปรียบเทียบกับวิธี IFA ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานพบว่าการทดสอบด้วยวิธี IP มี

ความไวเท่ากับร้อยละ 98.44 และความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 99.00 รวมถึงระดับไคเตอร์และรูปแบบการติดสีก็พบว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันอย่างมากมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าวิธีที่ได้รับการพัฒนาในครั้งนี้ น่าจะเป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจหาแอนตินิวเคลียร์แอนติบอดีต่อต้านวิธี IFA เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์โดยทั่วไป และมีความแม่นยำไม่แตกต่างจากวิธี IFA ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องพึ่งพาเครื่องมือพิเศษคือ กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ที่มีราคาแพงและมีใช้เฉพาะในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ นอกจากนั้นเทคนิคใหม่ที่พัฒนาขึ้นมานี้ยังมีข้อดีมากกว่าวิธี IFA อีกหลายประการ ได้แก่ สามารถเก็บสไลด์ไว้ได้นานโดยการติดสีไม่เปลี่ยนแปลง จึงทำให้สามารถดูผลซ้ำอีกหลายครั้งได้ เช่นกรณีต้องการปรึกษาผู้เชี่ยวชาญหรือการสอบกลับในการประกันคุณภาพ การตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยวิธีการเก็บนั้นสามารถทำได้ง่ายโดยการปิดขอบcover glass ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อไม่ให้ aqueous mounting medium แห้งและห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันแสงเท่านั้นและสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 1 ปี

นอกจากนี้รูปแบบการติดสีเมื่อใช้วิธี IP ยังมีความชัดเจนในการแยกรูปแบบ fine speckle และ coarse speckle ซึ่งมีความสำคัญเนื่องจากมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต่างกันและการแปลผลที่ต่างกัน โดย fine speckle จะเป็น anti-SS-A หรือ anti-SS-B ซึ่งสัมพันธ์กับโรค SLE หรือ Sjogren's syndrome ส่วน coarse speckle จะเป็น anti-Sm หรือ anti-nRNP ซึ่งสัมพันธ์กับโรค SLE หรือ mixed connective tissue diseases^(15, 16) ซึ่งการรายงานรูปแบบการติดสีที่ถูกต้องจะเป็นแนวทางการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไปอีกทั้งการตรวจด้วยวิธี IP ยังสามารถพบรูปแบบการติดสีแอกตินและไลโซโซมในไซโตพลาสซึมที่ชัดเจน โดย anti-actin มีความสัมพันธ์กับโรค chronic active hepatitis ส่วน anti-lysosome นั้น แม้ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์กับโรคแต่เป็นรายละเอียดที่ควรนำมาศึกษาค้นคว้าถึงความสัมพันธ์ของโรคต่างๆ รวมทั้งอาจจะเป็นองค์ความรู้ที่จะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการจัดจำแนกโรคต่างๆในอนาคตต่อไป อย่างไรก็ตามเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมานี้ยังคงเป็นเทคนิคที่ผู้ปฏิบัติการควรได้รับการอบรมฝึกฝนจากผู้เชี่ยวชาญเพื่อความแม่นยำและถูกต้องต่อผลของการตรวจนั่นเอง

จากการศึกษานี้พบผลบวกและลบชัดเจนจำนวน 2 ราย (ตารางที่ 1) ซึ่งมีรูปแบบการติดสีเป็น speckle โดยวิธี IP 1 ราย และ IFA 1 ราย (ตารางที่ 3) ซึ่งไม่มีแนวโน้มไปด้านใดด้านหนึ่ง และให้ผลบวกด้วยไคเตอร์ 1:80 ซึ่งเป็นการเจือจางต่ำสุดที่ทดสอบ อาจเกิดจากความคาดเคลื่อนของการทดสอบวิธีใดวิธีหนึ่งหรือทั้งสองวิธีจากการเจือจางซีรัมหรือขั้นตอนระหว่างทดสอบหรือการอ่านผล แต่คิดเป็นจำนวน 2 ราย จาก 164 รายจึงอยู่ในช่วง 95 % ของความเชื่อมั่นที่ยอมรับได้ทางสถิติ นอกจากนี้พบผลบวกที่มีรูปแบบการติดสีแตกต่างกันจำนวน 3 ราย คาดว่าจะเกิดความคลาดเคลื่อนเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น เนื่องจากทั้งสองวิธีมีความสามารถตรวจการติดสีได้ทุกรูปแบบเช่นเดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (AH-51-01-012) ขอขอบคุณบุคลากรกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและข้อมูลผลการตรวจ ANA โดยวิธี IFA ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์มงคลคุณากร และคุณอารียา ฌอนอนศักดิ์ยุทธ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการฝึกอ่านผลการตรวจ ANA โดยวิธี IFA

เอกสารอ้างอิง

1. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-58.
2. Fairweather D, Rose NR. Women and autoimmune diseases. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2005-11.
3. Kurien BT, Scofield RH. Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2006; 64: 227-35.
4. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.

5. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
6. Hoffman IE, Peene I, Meheus L, Huizinga TW, Cebecauer L, Isenberg D, et al. Specific antinuclear antibodies are associated with clinical features in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1155-8.
7. Adams LA, Lindor KD, Angulo P. The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1316-20.
8. Dahle C, Skogh T, Aberg AK, Jalal A, Olcen P. Methods of choice for diagnostic antinuclear antibody (ANA) screening: benefit of adding antigen-specific assays to immunofluorescence microscopy. *J Autoimmun* 2004; 22: 241-8.
9. Hooper B, Whittingham S, Mathews JD, Mackay IR, Curnow DH. Autoimmunity in a rural community. *Clin Exp Immunol* 1972; 12: 79-87.
10. Copple SS, Sawitzke AD, Wilson AM, Tebo AE, Hill HR. Enzyme-linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence confirmation of antinuclear antibodies: a statistical analysis. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 678-84.
11. Xu M, Robertss BB, Busby BA, Jack RM, Finn LS, Emery HM, et al. Evaluation of multiplex antinuclear antibody assay in pediatric patients. *Lab Med* 2007; 38: 671-5.
12. Lee SA, Kahng J, Kim Y, Park YJ, Han K, Kwok SK, et al. Comparative study of immunofluorescent antinuclear antibody test and line immunoassay detecting 15 specific autoantibodies in patients with systemic rheumatic disease. *J Clin Lab Anal* 2012; 26: 307-14.
13. Pollard KM, editor. Autoantibodies and autoimmunity: Molecular mechanisms in health and disease. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.
14. Copple SS, Giles SR, Jaskowski TD, Gardiner AE, Wilson AM, Hill HR. Screening for IgG antinuclear autoantibodies by HEp-2 indirect fluorescent antibody assays and the need for standardization. *Am J Clin Pathol* 2012; 137: 825-30.
15. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000; 53: 424-32.
16. Gonzalez-Buitrago JM, Gonzalez C. Present and future of the autoimmunity laboratory. *Clin Chim Acta* 2006; 365: 50-7.