

การเตรียมน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับ ตรวจหาแอนตินิวเคลียแอนติบอดี

ปกรณ์ ไทยานันท์* ยพิน สุศิริวัฒนนนท์**

บทคัดย่อ งานวิจัยนี้ใช้ทดสอบเตรียม DNA-latex agglutination (LA) kit ขึ้นเอง เมื่อนำไปทดสอบหาแอนตินิวเคลียแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย SLE จำนวน 104 ราย โดยศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี IF ผลปรากฏว่า LA kit มีความไว 85.5% มีความจำเพาะ 95.3% และมีความสัมพันธ์กันอย่างมากกับวิธี IF โดยให้ผลตรงกันทั้งบวกและลบ จำนวน 92 ราย หรือ 88.5% ส่วนผลที่ไม่ตรงกัน 12 ราย หรือ 11.5% เป็น IF+, LA- ทั้งสิ้น นอกจากนี้เมื่อนำ LA kit ไปทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยโรคอื่นๆ ผลปรากฏว่า ให้ผลบวกปลอมกับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ 4 ใน 20 ราย, โรคไทฟอยด์ 2 ใน 50 ราย และโรคซิฟิลิส 2 ใน 30 ราย ส่วนโรคติดเชื้อโปรโตซัว 20 ราย และผู้บริจาคโลหิต 50 ราย ให้ผลลบทั้งหมด รวมแล้ว LA kit ให้ผลบวกปลอม 4.7% ฉะนั้น LA kit ที่เตรียมขึ้นเองน่าจะนำไปใช้ตรวจหาแอนตินิวเคลียแอนติบอดีเพื่อช่วยวินิจฉัยโรค SLE ได้ เพราะมีความไวและความจำเพาะสูง ทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง จึงเหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป

คำรหัส : ลาเทกแซกกลูตินินชั้น, แอนตินิวเคลียแอนติบอดี, ความไว, ความจำเพาะ

Abstract : Preparation of DNA-latex kit for detection of antinuclear antibodies. Thaiyanan P* and Susiriwattananon Y*.* A preparation of latex agglutination (LA) kit by coating DNA on latex particles for the detection of antinuclear antibodies (ANA) in systemic lupus erythematosus (SLE) was described. Sensitivity and specificity of the LA kit were 88.5% and 95.3%, respectively, with great correlation with the indirect immunofluorescence (IF). Results of LA and IF tested in 104 SLE sera were the same in 92 cases (88.5%). On the other hand, discrepancy result was found in 12 case (11.5%). A kit was also studied in non-SLE sera; 4 out of 20 rheumatoid arthritis, 2 out of 50 typhoid fever and 2 out of 30 syphilis gave false positive results, whereas 20 sera of *E.histolytica* infection and 50 blood donor were all negative. In conclusion, the LA kit is adequately sensitive, specific and practical method to be

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2531

* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** หน่วยชันสูตรโรค โรงพยาบาลเด็ก กรุงเทพฯ

การวินิจฉัยโรค Systemic Lupus Erythematosus (SLE) ทางห้องปฏิบัติการอาศัยการตรวจหา antinuclear antibodies (ANA) เป็นหลัก ซึ่งวิธีตรวจหา ANA ทางห้องปฏิบัติการมีอยู่หลายวิธีได้แก่ immunodiffusion (1), complement fixation (2), latex or bentonite agglutination (3,4), passive cutaneous anaphylaxis (5), hemagglutination(6,7) indirect immunofluoresence (IIF)(8) enzyme-linked immunosorbent assay (9), และ radioimmunoassay (10) จะเห็นว่าการตรวจหา ANA มีหลายวิธีในแต่ละวิธีก็มีทั้งข้อดีข้อเสีย จึงต้องเลือกใช้ตามความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง ส่วนใหญ่แล้วนิยมใช้วิธี IIF (8) เพราะมีความไวสูง และยังสามารถแยกชนิดของแอนติบอดีได้ด้วย (11) ที่นิยมรองลงมาได้แก่วิธี hemagglutination เนื่องจากทำได้ง่าย เครื่องมือไม่แพง แต่ทำนายาเก็บได้ไม่นาน งานวิจัยนี้จึงได้เลือกวิธี latex agglutination (LA) มาศึกษาพัฒนา เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย อ่านผลได้รวดเร็วและความไวสูง เครื่องมือก็ไม่ต้องใช้อะไรมาก แต่มีข้อเสียคือต้องซื้อน้ำยาเป็นชุด (kit) จากต่างประเทศ จึงมีราคาแพง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเคลือบ DNA บนเม็ดลาเท็กซ์ (latex) เพื่อนำไปตรวจหาแอนติบอดีต่อนิวเคลียสในคนไข้ SLE โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน คือ IIF ต่อไป

used for the detection of ANA in SLE patients. Bull Chiang Mai AMS 24(2): 73-80.

Keyword: latex agglutination, antinuclear antibody, sensitivity, specificity.

วัสดุและวิธีการ

ซีรัม จากผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นโรค SLE ที่ส่งมาตรวจหา ANA ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 104 ราย จากผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อ rheumatoid factor test 20 ราย, widal test (titer ต่อ O antigen > 80, H antigen > 160) 50 ราย, VDRL test (titer > 8) 30 ราย, E.histolytica hemagglutination test (titer > 640) 20 ราย และผู้ป่วยจากโลหิต 50 ราย ซีรัมทั้งหมดนี้เก็บไว้ที่ -20 °ซ จนกว่าจะนำออกมาทดลอง

วิธีเตรียม DNA จากเม็ดเลือดขาว (12) ใช้มีามหนู 50 กรัมผสมกับ citrate buffer saline, pH 7.4 (CBS) 200 มล. บั่นในเครื่อง blender กรองผ่านผ้าก๊อช บั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง นำเซลล์มาละลายใน lysis buffer 3 ครั้งเพื่อกำจัดเม็ดเลือดแดง นำเม็ดเลือดขาวที่ได้มาละลายใน 2.6 M NaCl 100 มล. เติม 5% SDS-45% EtOH ลงไปอีก 5 มล. คนให้เข้ากันกับไวโนตุยีนข้าม

This work was supported by a research grant from The National Council Foundation.

* Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University

** Laboratory Diagnostic Unit, Children Hospital, Bangkok

คืน แล้วนำออกมาปั่นกับน้ำในส่วนบนไว้ เติมด้วย 95% EtOH ลงไปช้าๆ คนด้วยแท่งแก้ว จะได้เส้นตะกอนของ DNA พันติดแท่งแก้ว ขูดออกมาล้างใน 75% EtOH 2-3 ครั้ง ละลายตะกอน DNA ใน citrate buffer เก็บไว้ที่ -20 °ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้ (หมายเหตุ : น้ำยาที่ใช้ทั้งหมดต้องทำให้เย็นก่อน)

วิธีเคลือบ DNA บนเม็ดลาเทค นำ DNA ที่เจือจางใน 0.1 M glycine buffer saline, pH 8.2 (GBS) 1 ส่วนมาผสมกับลาเทค 1 ส่วนและ GBS อีก 1 ส่วนนำไปเขย่าใน shaker bath 37 °ซ นาน 1 ชม. แล้วปั่นล้างด้วย GBS ที่ผสมด้วย 0.2% tween-20 2 ครั้งสุดท้ายนำมาละลายใน GBS ที่มี 0.5% bovine serum albumin (BSA) ผสมอยู่ด้วยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของลาเทคประมาณ 10%

วิธีทดลอง หยดซีรัมที่ต้องการทดสอบ 1 หยดผสมกับ DNA-latex 1 หยด กวนด้วยไม้จิ้มฟันประมาณ 3 นาที อ่านผลโดยดูการจับกลุ่มกันของเม็ดลาเทค แล้วให้ระดับความแรงของการจับกลุ่มเป็น 1+ ถึง 4+ ตามลำดับ ถ้าไม่จับกลุ่มถือว่าให้ผลลบ

การทดสอบความไว นำซีรัมผู้ป่วย SLE มา 3 ราย เจือจางด้วย GBS ให้เป็น 1:5, 1:10 จนถึง 1:640 นำแต่ละส่วนมาทดสอบด้วยวิธี LA และ IF เพื่อเปรียบเทียบกันและทดสอบกับซีรัมของผู้สงสัยว่าจะเป็นโรค SLE 104 รายด้วย

การทดสอบความจำเพาะ นำ DNA-latex ที่เตรียมได้ไปทดสอบกับซีรัมของผู้ที่เป็นโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ SLE ได้แก่ ข้ออักเสบรูมาตอยด์, ไทฟอยด์, ซิฟิลิส, ติดเชื้ออหิวา และ ซีรัมของ

คนปกติ

การทดสอบความคงตัว นำ DNA-latex ไปเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °ซ เมื่อครบแต่ละสัปดาห์นำออกมาทดสอบ กับซีรัมบวกและลบที่แบ่งเก็บไว้ที่ -80 °ซ

การทดสอบความเชื่อถือได้ โดยเก็บซีรัมที่ให้ผลบวก (2+) ในวิธี LA แบ่งใส่ขวดเล็กๆ เก็บไว้ที่ -80 °ซ หลังจากเก็บได้ 0, 3, 7 และ 14 วัน นำออกมาทดสอบกับ DNA-latex ที่เก็บไว้ในตู้เย็นครั้งละ 5 หลอด

ผลการทดลอง

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบ DNA บนเม็ดลาเทค พบว่าความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมคือ 1:4 หรือ 1:8 ปริมาณของ Tween-20 ที่ใช้ผสมกับ GBS สำหรับล้างคือ 0.2%, pH ของ buffer 7.8-10.0 ส่วนเวลาสำหรับการเคลือบ 30-60 นาที และอุณหภูมิที่เหมาะสม 37 °ซ การหาความไวของวิธี LA เทียบกับ IF พบว่าวิธี IF มีความไวโดยเฉลี่ยสูงกว่า LA ประมาณ 20 เท่า ดังเช่น รายที่ 1 32 เท่า ($640/20=32$) รายที่ 2 16 เท่า และ รายที่ 3 20 เท่า (ตารางที่ 1) การหาความจำเพาะของ DNA-latex ปรากฏว่าให้ผลบวกปลอมกับผู้ที่เป็นโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ 4 ใน 20 ราย (20%), โรคไทฟอยด์ 2 ใน 50 ราย (4%), โรคซิฟิลิส 2 ใน 30 ราย (6.7%) ส่วนผู้ติดเชื้ออหิวา (*E.histolytica*) และผู้บริจาคเลือดให้ผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 2) เมื่อคิดรวม 170 ราย ให้ผลบวกปลอม 8 ราย คิดเป็น 4.7% หรือคิดเป็นค่าความจำเพาะได้เท่ากับ 95.3% การหาความคงตัวโดยเก็บ LA kit ไว้ที่ 4 °ซ เมื่อนำ

มาทดสอบกับซีรัม 4+ ในแต่ละสัปดาห์ ปรากฏว่าหลังจากเก็บไว้ได้นาน 4 สัปดาห์ ปฏิกริยาเริ่มลดลงจาก 4+ เป็น 3+ และในสัปดาห์ที่ 5 เหลือ 2+ (ตารางที่ 3)

การหาค่าความเชื่อถือได้ของ DNA-latex โดยนำออกมาทดสอบกับซีรัมที่ให้ผลบวกระดับ 2+ จำนวน 5 ราย หลังจากเก็บซีรัมนั้นไว้เป็นเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน ผลปรากฏว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในปฏิกริยาเลย (ตารางที่ 4)

การเปรียบเทียบวิธี LA และ IIF ในการตรวจหาแอนตินิวเคลียแอนติบอดีในผู้ป่วย SLE จำนวน 104 ราย ปรากฏว่าให้ผลตรงกันทั้งบวกและลบ 92 ราย คิดเป็น 88.5% (ตารางที่ 5) และผลไม่ตรงกัน 12 ราย เป็น IIF บวก ส่วน LA ลบทั้งหมด และไม่พบ LA บวก, IIF ลบเลย

วิจารณ์

การตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบันวิธี agglutination ให้ผลเร็วที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี LA ใช้เวลาเพียง 2-3 นาทีก็อ่านผลได้แล้ว

และเป็นวิธีที่ให้ผลเชื่อถือได้ทั้งในแง่ความจำเพาะ, ความไวและความคงตัว ผู้วิจัยจึงพยายามที่จะพัฒนาวิธี LA เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบหรือวินิจฉัยโรคให้มีมากยิ่งขึ้น ปัญหาใหญ่ของวิธี LA คือ latex particle มีราคาแพงมาก (ซีซีละพันกว่าบาท) จึงไม่มีใครกล้าที่จะซื้อมาทำการทดลองสำหรับ latex ที่ใช้ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เตรียมขึ้นมาเองจากวัสดุที่เหลือใช้ (microtiter plate) เคยทดลองเคลือบลาเทคด้วยโกลบูลิน ซึ่งเป็นโปรตีนเพื่อใช้ตรวจหาปริมาณของแอนติเจนก็ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (13) งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองกับสาร DNA บ้าง จุดสำคัญในการเคลือบสารบนลาเทคนั้นจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของสิ่งที่เกี่ยวข้อง อันได้แก่ ปริมาณของแอนติเจนที่จะนำไปเคลือบปริมาณลาเทค ชนิดของ coating buffer ความเป็นกรดต่าง รวมทั้งสภาวะอื่นๆ จะเห็นว่างานวิจัยนี้ไม่ได้หาปริมาณของ DNA ที่แน่นอนออกมาว่าเป็นเท่าไรสำหรับการเคลือบในครั้งนั้นๆ เนื่องจากว่าในการเคลือบแต่ละครั้งนั้นจะต้องทำ titration ทุกครั้งจึงจะได้ผลดี

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบความไวของวิธี LA กับ IIF

method	Titer of serum		
	No.1	No.2	No.3
IIF	640	160	20
LA	20	10	1

ตารางที่ 2 แสดงความจำเพาะของ DNA latex

Disease	No.	DNA latex		% Positive
		Positive	Negative	
Rheumatoid arthritis	20	4*	16	20
Typhoid	50	2	48	4
Syphilis	30	2*	18	6.4
E.hist infection	20	0	20	0
Blood donor	50	0	50	0
Total	170	8	162	4.7
%	100	4.7	95.3	

* ให้ผลบวกกับ IIF ด้วย

ตารางที่ 3 แสดงความคงตัวของ DNA latex ที่เก็บไว้ที่ 4°C

Serum	Week					
	0	1	2	3	4	5
Positive	4+	4+	4+	4+	3+	2+
Negative	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 4 แสดงความเชื่อถือได้ของ DNA latex

Serum	Day			
	0	3	7	14
Positive 2+ (5 sample)	5/5	5/5	5/5	5/5

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบวิธี LA กับ IIF ในการตรวจหา ANA ในซีรัมผู้ป่วย SLE 104 ราย

จำนวน	ผลตรงกัน		ผลไม่ตรงกัน	
	LA-,IIF-	LA+,IIF+	LA-,IIF+	LA+,IIF-
104	21	71	12	0
%	88.5		11.5	

วิธีการเคลือบส่วนใหญ่อาศัยวิธีของ Singer and Plotz(14) แต่วิธีดังกล่าวไม่มีการปั่นล้างเม็ดลาเท็กซ์หลังจากเคลือบแอนติเจนแล้ว คือนำไปใช้เลยโดยไม่มีการล้างเอาแอนติเจนส่วนเกินออกจึงอาจจะทำให้ความไวของการทดสอบลดลง ทำนองเดียวกัน pH ของ buffer ถ้าสูงหรือต่ำเกินไปอาจทำให้ความไวลดลงเช่นกัน แต่ถ้อยอยู่ในช่วง 7.8-10.0 พบว่าความไวไม่เปลี่ยนแปลง (ไม่ได้แสดงผล) ปริมาณ DNA ก็เช่นเดียวกันถ้าใช้มากหรือน้อยไปก็ทำให้ความไวลดลง (ไม่ได้แสดงผล) สำหรับเวลาในการเคลือบ 30 นาที ให้ผลสูงสุดแล้ว แต่งานวิจัยนี้ใช้ 60 นาที ตลอดเพื่อกันความผิดพลาด สำหรับอุณหภูมิที่ 37 °ซ และ 45 °ซ ผลไม่ต่างกันแต่ถ้าทำที่ 25 °ซ หรือ 56 °ซ ความไวลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ไม่ได้แสดงผล)

การหาความไวของวิธี LA เมื่อเทียบกับวิธี IF พบว่าวิธี LA มีความไวต่ำกว่าประมาณ 20 เท่า (ตารางที่ 1) ซึ่งตามความเป็นจริงวิธี LA น่าจะมีความไวสูงกว่านี้ คือมีความไวต่ำกว่า IF ประมาณ 5 เท่า(15) แต่เมื่อเปรียบเทียบวิธีทั้งสองในการตรวจหา DNA ในซีรัมผู้ป่วยรายต่อรายแล้วพบว่าให้ผลบวกและลบตรงกัน 92 ใน 104 ราย หรือมีความไว 88.5% (ตารางที่ 5)

ความจำเพาะของ DNA-latex มีค่า 95% (ตารางที่ 2) ซึ่งนับว่าสูงมาก แต่ถ้าดูเฉพาะโรคจะเห็นว่าโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ให้ผลบวกปลอมถึง 20% ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Fessel และคณะ (3) ที่ให้ผลบวกปลอม 22% แต่ถ้าทำด้วยวิธี hemagglutination ให้ผลบวกปลอมถึง 52% ส่วน Harisdangkul และ Bhuvanath (16) ให้ผลบวกปลอม 4.4% (1 ใน 22 ราย) นอกจากนั้น DNA-latex ยังให้ผลบวกปลอมกับซีฟิไลสได้

อีก 6.7% Ellat และคณะ (10)ทดสอบด้วยวิธี RIA ให้ผลบวกปลอมกับโรคิฟิไลส 20% (3 ใน 15) DNA-latex ที่เตรียมขึ้นเองนี้ยังมีความคงตัวค่อนข้างต่ำ คือคงตัวอยู่ได้เพียง 1 เดือน ปฏิกริยาก็เริ่มต่ำลง (ตารางที่ 3) จากการเปรียบเทียบการเติมและไม่เติม BSA ลงไปด้วย ปรากฏว่าถ้าไม่เติม BSA ลงไปจะเก็บไว้ได้นานกว่าในเรื่องของความคงตัวนี้ยังต้องศึกษากันต่อไป อย่างไรก็ตามในเรื่องของความเชื่อถือได้นั้น (ตารางที่ 4) จากการทดลองทำซ้ำๆ กัน 4 ครั้งๆ ละ 5 ตัวอย่าง ในช่วง 2 สัปดาห์ ผลไม่แตกต่างกันเลย แสดงว่าวิธี LA เป็นวิธีที่เชื่อถือได้

เอกสารอ้างอิง

1. Arana R, and Seligmann M. Antibodies to native and denatured DNA in SLE. J Clin Invest 1967;46:1867-70.
2. Robbins WC, Holman HR, Deicher H, and Kunkel HG. Complement fixation with cell nuclei and DNA in systemic lupus erythematosus. Proc Soc Exp Biol Med 1957;96:575-9.
3. Fessel WJ, Epstein WV, Engleman EP. Immunological studies in the connective tissue diseases. Proc Soc Exp Biol Med 1958;98: 820-3.
4. Bozicevich J, Nasou JP, and Kayhoe DE. Deoxyribonucleic acid (DNA)-betonite flocculation test for lupus erythematosus. Proc Soc Exp Biol Med 1960;103:636-40.

5. Deicher HGR, Holman HR, and Kunkel HG. Passive cutaneous anaphylaxis with systemic lupus erythematosus : serum factor and isolated DNA. J Immunol 1960; 84:106-11.
6. Jokinen EJ, and Julkunen H. DNA hemagglutination test in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 1965;24:477-80.
7. Inami YH, Nakamura RM, and Tan EM. Microhemagglutination test for detection of native and single-stranded DNA antibodies and circulating DNA antigen. J Immunol Methods 1973;3:287-9.
8. Tilkian SM, Conover MB, and Tilkian AG. Clinical implication of laboratory test. 2nd ed. The C.V. Mosby Company Press, London. 1979;217-20.
9. Mach PS, Brouilhet H, and Inserm A. D-penicillamine : a modulation of anti-DNA antibodies productions. Clin Res 1959;7: 121-2.
10. Eilat D, Zlotnick AY, and Fischel R. Evaluation of the cross-reaction between anti-DNA and anti-cardiolipin antibodies in SLE and experimental animals. Clin Exp Immunol 1986;65:269-78.
11. Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, and Wells JV. Basic and Clinical Immunology. 4th ed. Lange Medical Publication. California USA. 1982;430-34.
12. พนม พุตระกูล, สุริย์ พุตระกูล และ ศิริวัฒน์ สารเวก. Experimental method in Biochemistry. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2526;71-73.
13. ปกรณ์ ไทยานันท์. การผลิตน้ำยารูมาตอยด์-แพคเตอร์เทสต์ เพื่อใช้เอง. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2533 (อัดสำเนา)
14. Singer JM, and Plotz CM. The latex fixation test I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Am J Med 1956;21:888-92.
15. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, and Wood WB. Jr. Microbiology. 2nd ed. Harper & Row Publishers. Inc. Maryland. USA. 1973;394.
16. Harisdangkul V, and Bhuvanath S. Detection of anti-DNA antibody by Ouchterlony immunodiffusion, counter-current immunoelectrophoresis and passive hemagglutination titration technique. J Med Ass Thailand 1975;58(2):641-20.