



A COMPARATIVE STUDY OF VARIOUS SUBSTRATES FOR THE DETECTION OF ANF

พัชรวิทย์ พิชัยพลากร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ปกรณ โทยานันท์ วท.บ. (จุลชีววิทยา)*

สนิท มกรแก้วเกียร Ph.D.*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับ antinuclear factor (ANF) โดยวิธี indirect immunofluorescence โดยการทดลองเปรียบเทียบ substrates 4 ชนิด คือ rat liver cell, chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell ในแง่ของ antigenicity และ stability พบว่า rat liver cell มีคุณสมบัติของ antigenicity และ stability สูงที่สุด เนื่องจากมีคุณสมบัติที่คล้ายหลายประการ คือ ให้ผล positive ได้มากกว่า, ง่ายและชัดเจน, ใช้ตรวจหา antinuclear antibody ได้หลายชนิด และสามารถบอก pattern ต่าง ๆ ของการเรืองแสงได้ ตลอดจนยังเก็บไว้ได้นานอีกด้วย ฉะนั้น rat liver cell จึงเป็น substrate ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ตรวจหา ANF โดยวิธี indirect immunofluorescence.

บทนำ

ในการศึกษาเกี่ยวกับ autoimmune diseases โดยเฉพาะอย่างยิ่ง systemic lupus erythematosus (SLE) นิยมใช้วิธี indirect immunofluorescence สำหรับตรวจหาการจับของ ANF ใน serum ของผู้ป่วย substrate ที่ใช้เป็น

antigen มีความสำคัญมากสำหรับวิธีนี้ ถ้า substrate ที่ใช้มีคุณสมบัติที่มี antigenicity สูง จะทำให้ sensitivity ของ test สูงขึ้นด้วย นั้นหมายความว่าทำให้การตรวจพบ ANF ง่ายขึ้นด้วย มี substrate อยู่หลายชนิด ที่ใช้สำหรับตรวจหา ANF เช่น human white

* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

blood cell, chicken red blood cell, rat liver cell, rat kidney cell เป็นต้น เคยมีผู้ทดลองพบว่า human white blood cell มีคุณสมบัติเป็น antigen ที่ sensitive ที่ ในการตรวจหา ANF แต่ไม่ได้เปรียบเทียบ sensitivity กับ substrate อื่น ๆ อีก หาเพียงแต่ว่าสามารถใช้ตรวจหา ANF ได้ในหลาย ๆ โรคด้วยกัน (1,2) และมีบางท่านพบว่า rat kidney cell และ human white blood cell ตีกว่า chicken red blood cell⁽³⁾ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อจะเปรียบเทียบว่าระหว่าง rat liver cell, chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell ชนิดไหนจะเป็น substrate ที่เหมาะสมที่สุด และ pattern ของการเรืองแสงต่างกันอย่างไร ในการตรวจหา ANF โดยวิธี indirect immunofluorescence

วัตถุประสงค์และวิธีการ

A. Substrates

1. Rat liver cell; fresh rat liver นำมาทำ frozen section หนาประมาณ 4-6 micron วางบนแผ่นสไลด์, fix ใน cold acetone แล้วนำไปเก็บไว้ใน deep freezer (-20°C) จนกว่าจะนำออกมาใช้

2. Human white blood cell; ใช้เลือกคน group O แยก white cell ออกมาด้วยวิธี dextran floatation ล้าง 3 ครั้ง นำไป dilute ให้เป็น 1:200 (50 cells/high

power field) smear บนสไลด์ ปล่อยให้แห้งนำไป fix ใน cold acetone เหมือนกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

3. Chicken red blood cell; ใช้เลือกไก่ที่เก็บไว้ใน Alsever's solution (v/v) นำมาล้างและ dilute เหมือนข้อที่ 2.

4. Goose red blood cell; เตรียมวิธีเดียวกับ chicken red blood cell

B. Serum

ใช้ serum ของคนไข้ที่แพทย์ให้การวินิจฉัยว่าเป็น SLE 43 ราย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้หญิงอายุระหว่าง 21-48 ปี สำหรับ negative control serum ได้จาก donor ที่มาชายเลือกให้แก่นักหน่วยธนาคารเลือด ซึ่งเป็นผู้ชายทั้งหมด นำมาหา antibody titer โดยใช้ substrate ทั้ง 4 เป็น antigen

C. Indirect immunofluorescent method

นำสไลด์ substrate ทั้งสี่ออกจาก deep freezer แล้วปล่อยให้แห้ง หยดแต่ละ dilution ของ serum ของคนไข้ที่ต้องการหา antibody titer โดย dilute serum เป็น serial two-fold dilution ด้วย phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 ลงบน substrate ทั้งสี่อย่างละหนึ่งหยด นำไปใส่ใน moist chamber แล้วอบที่ 37°C , 30 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์ substrate มาล้างด้วย PBS, 30 นาที ปล่อยให้แห้งแล้วย้อมด้วย fluorescein iso-

thiocyanate antihuman gamma globulin อีก 30 นาที นำสไลด์มาล้างเหมือนเดิม ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้อง fluorescent ในการทดลองแต่ละครั้งได้ทำ positive และ negative control sera ไปด้วยทุกครั้ง ถ้าใน serum มี ANF จะเห็นว่าบริเวณ nucleus ของ cellเรืองแสงสีเขียวแกมเหลือง แต่ถ้าไม่มี ANF บริเวณ nucleus จะมืดไป การอ่าน titer ของ serum โดยการเรืองแสงของแต่ละ dilution ของ serum จนกระทั่งถึง dilution สุดท้าย ที่ยังให้ผล positive การเรืองแสงซึ่งถึง dilution นั้นเป็น titer.

ผลการทดลอง

จากคนไข้ที่สงสัยว่าจะเป็น SLE 43 ราย ให้ผล positive ANF กับ rat liver cell 30 ราย ส่วนกับ substrate อื่น ๆ ให้ผล positive เพียง 11 ราย และไม่พบเลยว่า rat liver cell ให้ผล negative แล้ว substrate อื่นให้ผล positive เมื่อใช้ rat liver cell เป็น substrate ได้ค่า ANF titer เฉลี่ยเท่ากับ 172 กับ chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 38, 32 และ 21 ตามลำดับ และถ้าให้เปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ rat liver cell เป็น 100% จะได้เปอร์เซ็นต์การเรืองแสง chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell มีค่าเท่ากับ 22, 18, และ 12 ตามลำดับ

(ตารางที่ 1) สำหรับ serum ของคนไข้ 13 รายก็ให้ผล negative ANF กับ rat liver cell เมื่อนำมา test กับ chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell พบว่าให้ผล negative เช่นเดียวกัน และ normal control serum จาก donor ปกติ 20 รายให้ผล negative test กับ substrate ทุกชนิดเช่นเดียวกัน

rat liver cell เท่านั้นที่สามารถแยก pattern ของการเรืองแสงได้ ส่วน substrate อื่น ๆ ให้เป็นแบบ peripheral type เหมือนกันหมด ในคนไข้ 30 รายนี้ พบว่าให้ homologous ร่วมกับ peripheral type 10 ราย, homologous ร่วมกับ speckled type 4 ราย, homologous อย่างเดียว 3 ราย และ speckled type อย่างเดียว 13 ราย สำหรับ nucleolar type ไม่พบเลย ในการทดลองนี้ และพบว่า serum ที่ให้การเรืองแสงแบบ speckled type ให้ผล negative test กับ substrate อื่น ๆ ทั้งหมด (serum no. 14-30)

วิจารณ์

จากผลการทดลองโดยใช้ serum ของคนไข้ที่สงสัยว่าจะเป็น SLE เพื่อหา ANF โดยวิธี indirect immunofluorescence พบว่า rat liver cell เป็น substrate ที่มี antigenicity ที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ substrate อื่นอีกสามชนิด และ human white blood cell มี antigenicity ต่ำที่สุด ก็ยังต่ำกว่า chicken

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบ antinuclear antibody titer ที่ได้จาก substrate แต่ละชนิด

Serum No.	Antinuclear antibody titer				pattern of fluorescence
	rat liver cell	chicken red blood cell	goose red blood cell	human white blood cell	
1	20	160	80	80	H, P
2	160	40	20	20	H, P
3	80	80	40	40	H, P
4	160	40	40	40	H, P
5	160	320	320	320	H, P
6	40	40	40	160	H, P
7	80	40	40	20	H, P
8	40	0	0	0	H, P
9	10	10	10	20	H, P
10	80	0	0	0	H, P
11	80	80	40	20	H
12	160	160	160	20	H
13	80	160	160	40	H
14	40	0	0	0	H, S
15	80	0	0	0	H, S
16	80	0	0	0	H, S
17	20	0	0	0	H, S
18	80	0	0	0	S
19	10	0	0	0	S
20	320	0	0	0	S
21	20	0	0	0	S
22	640	0	0	0	S
23	640	0	0	0	S
24	640	0	0	0	S
25	320	0	0	0	S
26	160	0	0	0	S
27	160	0	0	0	S
28	10	0	0	0	S
29	160	0	0	0	S
30	640	0	0	0	S
Mean	172	38	32	21	
%Fluorescence	100	22	18	12	

H = homogenous type

S = speckled type

P = peripheral type.

red blood cell ซึ่งมีผู้ทดลองบางท่านพบว่า human white blood cell มี antigenicity สูงกว่า chicken red blood cell⁽³⁾ การดู pattern ของการเรืองแสงเมื่อใช้ rat liver cell กว้างกว่าและชัดเจนดีกว่า substrate อื่น ๆ pattern ของการเรืองแสงพอจะบอก clinical syndrome ได้ เช่น SLE, rheumatoid arthritis, mix connective tissue or scleroderma และ myositis ส่วนจะพบแบบ peripheral, homogenous, speckled และ nucleolar types ตามลำดับ สำหรับ SLE ให้ผล positive ANF ถึง 9% (4,5) จะเห็นว่า speckled type หรือ homogenous รวมกับ speckled type ถึงแม้จะมี titer สูง กับ rat liver cell แต่กับ substrate อื่นให้ผล negative ทั้งหมด ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก speckled type เกิดจากมี antibody ไป react ต่อ nuclear component บางอย่างบน rat liver cell แต่ไม่มีใน human white blood cell, chicken red blood cell, และ goose red blood cell⁽⁶⁾

ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองเก็บ substrate ทั้งสี่ที่ -20°C แล้วนำมาตรวจผลของการเรืองแสงทุก ๆ สัปดาห์ พบว่า rat liver cell เก็บไว้ได้นานที่สุด อย่างน้อย 9 สัปดาห์ โดยยังมีคุณภาพของการเรืองแสงเหมือนเดิม ส่วน chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell เก็บได้นานอย่างน้อย 5 สัปดาห์ แต่สำหรับ human white blood cell ดูเหมือนว่าจะเก็บไว้ได้

นานกว่า chicken และ goose red blood cell เนื่องจากสัปดาห์ที่ 9 ยังให้ผล positive ชัดเจนที่ (+3) substrate ที่จะนำมาเป็น antigen สำหรับวิธี indirect immunofluorescence นั้น ถ้าให้การเรืองแสงต่ำกว่า +3 แล้ว ไม่ควรนำมาใช้เป็น antigen.

Abstract

Four different kinds of substrates for detecting antinuclear factor (ANF) using indirect immunofluorescent method have been studied in this paper. The antigenicity and stability of this four substrates; rat liver cell, chicken red blood cell, goose red blood cell, and human white blood cell were compared. It was found that the antigenicity and stability of liver cell were better than the other three substrates, because when using rat liver cell, it was easy to be detected, more positive result, differentiated pattern of fluorescence, and more than one kind of antibodies could be detected. In addition, rat liver cell could be preserved more than 9 weeks at -20°C with no loss of antigenicity. Therefore, rat liver cell was a suitable substrate for indirect immunofluorescence.

เอกสารอ้างอิง

1. Gibson, D.C., and Quarles, J.M. : Immunofluorescent detection of antinuclear factor using washed pooled peripheral human leukocyte. *Am. J. Clin. Path.* 51 : 440-444, 1969.
2. Faber, V., Elling, P., Norup, G., Mansa, B., and Nissen, N.I. : An antinuclear factor specific for leukocyte. *Lancet* 2: 344-345, 1964.
3. Clamate, J.E., and Nakamura, R.M. : Indirect immunofluorescent antinuclear antibody test.: Comparison of sensitivity and specificity of different substrates. *Am. J. Clin. Path.* 58 : 388-393, 1972.
4. Fries, J.E., and Holman, H.R. : Systemic lupus erythematosus : A clinical analysis. W.B. Saunders company. Philadelphia, London, Toronto. pp. 104-120, 1975.
5. Husain, M., Neff, E., Daily, E., Townsend, J., and Lucar, F. : Clinical significant of titer and fluorescent pattern. *Am. J. Clin Path.* 61: 59-65, 1974.
6. Tan, E.M. : Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in SLE. *J. Lab. Clin Med.* 70:800-812, 1967.