

Review article

Detection of paraprotein in immunology laboratory

Kanthika Bootdee^{1,*}, Sompong Boonhai²

¹*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

²*Antiserum and standard cell preparation section, National Blood Centre, The Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand*

Abstract

Paraprotein is the immunoglobulin or immunoglobulin components that generated by the abnormal clones of plasma cells or other B-cell lineage (monoclonal or oligoclonal) and can be detected in the blood or urine. Paraprotein detection is using for the diagnosis of lymphoproliferative disorder, especially multiple myeloma. There are several laboratory methods for paraprotein detection, including; 1) the screening test of abnormal immunoglobulin formation using protein electrophoresis ; and 2) the tests for identify immunoglobulin isotype or components using Immunoelectrophoresis, Immunotyping electrophoresis, or Immunofixation electrophoresis. Additionally, immunoturbidimetric method and immunonephelometric method are high sensitivity tests that are used to monitor treatment, including the detection of minimal residual disease, but requires more sophisticate tools. As such, detection of paraproteins leads to the accurate diagnosis and the effective monitoring which will be associated with the better treatment outcomes.

Keywords: Paraprotein, myeloma, immunoglobulin.

***Correspondence to:** Kanthika Bootdee, Department of Microbiology Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

E-mail: kantika_ying@hotmail.com

Received: June 28, 2021

Revised: November 9, 2021

Accepted: December 9, 2021

บทฟื้นฟูวิชาการ

การตรวจวิเคราะห์ paraprotein ทางห้องปฏิบัติการ ภูมิคุ้มกันวิทยา

กัญจิกา บุตรดี¹, สมพงษ์ บุญให้²

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²ฝ่ายผลิตภัณฑ์แอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

Paraprotein เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่ผิดปกติ โดยโปรตีนเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นจาก clone ที่ผิดปกติของ B-cell lineage และสามารถตรวจพบได้ในเลือดหรือปัสสาวะ ซึ่งมักบ่งบอกถึงโรคในกลุ่ม lymphoproliferative disorder โดยเฉพาะอย่างยิ่ง multiple myeloma ซึ่งโรคเหล่านี้มีการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน หรือ ส่วนประกอบของอิมมูโนโกลบูลินชนิดใดชนิดหนึ่งมากเกินไปผิดปกติ โดยการตรวจ paraprotein ทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจคัดกรองโดยวิธี protein electrophoresis เพื่อดูว่าผู้ป่วยมีการสร้างอิมมูโนโกลบูลินที่ผิดปกติหรือไม่ การตรวจจำเพาะโดยวิธี immunoelectrophoresis, immunotyping electrophoresis และ immunofixation electrophoresis เพื่อดูชนิดของ paraprotein ส่วนการตรวจวัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลิน โดยวิธี immunoturbidimetric method และ immunonephelometric method เพื่อการติดตามการรักษาและการตรวจหายโรคเล็กน้อยที่เหลืออยู่หลังการรักษา (minimal residual disease) ดังนั้นการตรวจ paraprotein ทางห้องปฏิบัติการที่มีความถูกต้องแม่นยำ และความไวสูงนั้น ต้องอาศัยเครื่องมือและความชำนาญของผู้ทำการวิเคราะห์ ซึ่งช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรคเหล่านี้ได้ถูกต้องต่อไป

คำสำคัญ: Paraprotein, myeloma, อิมมูโนโกลบูลิน.

Paraprotein เป็นโปรตีนที่ผิดปกติในเลือดที่พบได้บ่อยในโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยา (hematologic malignancy) ส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางคลินิกหลายอย่าง⁽¹⁾ โดย paraprotein ที่พบในโรคทางโลหิตวิทยานั้น มักพบร่วมกับโรคในกลุ่ม lymphoproliferative diseases ซึ่งเกิดจากการทำงานอย่างผิดปกติของ B-cell ในระยะต่าง ๆ กันนำไปสู่โรคในกลุ่ม leukemia, lymphoma และ plasma cell disorders ดังแสดงในตารางที่ 1 ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งในกลุ่ม lymphoproliferative diseases นี้จึงมีโอกาสพบปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินที่มากผิดปกติ โดยเป็นอิมมูโนโกลบูลินที่สร้างขึ้นจากกลุ่มของเซลล์เพียงกลุ่มเดียว (single clone) จึงทำให้เกิดลักษณะอิมมูโนโกลบูลินที่มีความเหมือนกัน โดยดูได้จากขนาดของโปรตีนและประจุไฟฟ้าเรียกว่า monoclonal immunoglobulin รู้จักกันในชื่อ paraproteinemia ซึ่งเป็นปัจจัยบ่งชี้ต่อการเกิดมะเร็ง (tumor marker) ที่เก่าแก่ที่สุดในประวัติศาสตร์ของการรักษาโรคแผนใหม่ โดยเกิดขึ้นในสมัยที่ เทียบเคียงได้กับช่วงรัชสมัยของพระเจ้าอยู่หัวรัชกาลที่ 4 ในประเทศไทย ดังเห็นได้จากการเรียกชื่อโปรตีนนี้อีกหลาย ๆ ชื่อ อาทิเช่น myeloma protein, monoclonal protein, M protein, monoclonal immunoglobulin, gammopathy, monoclonal gammopathy, paraproteinemia, dysproteinemia, monoclonal spike และ M spike

อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin: Ig)

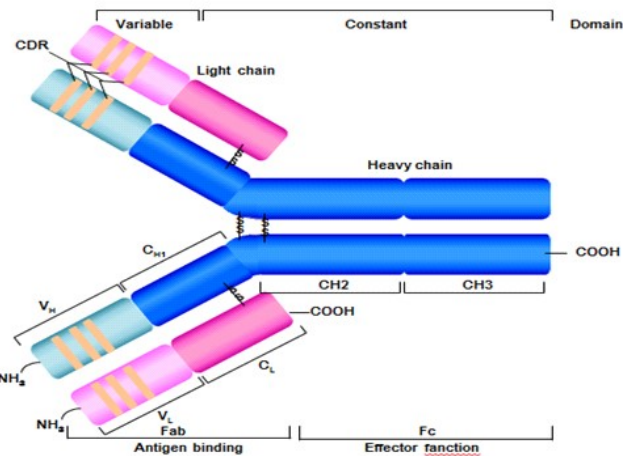
ในการตอบสนองต่อแอนติเจนด้วยโมเลกุลที่อยู่ในลักษณะสารน้ำ (humoral immune response: HIR) นั้น

B lymphocyte ที่ได้รับการกระตุ้นจะมีการเพิ่มจำนวนและแบ่งตัวกลายเป็น plasma cells แล้วทำการสร้างอิมมูโนโกลบูลินหลั่งออกมาสู่กระแสเลือดและสิ่งคัดหลั่งต่าง ๆ ทั่วร่างกาย⁽³⁾ ทำหน้าที่เป็นแอนติบอดี ซึ่งสามารถจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะและก่อให้เกิดผล (effector function) ต่าง ๆ ตามมาเพื่อทำลายแอนติเจนนั้น ๆ ในเลือด แอนติบอดีจะอยู่ในน้ำเหลือง (serum) และน้ำเหลืองที่มีแอนติบอดีที่สามารถจับกับเชื้อโรคหรือสารพิษต่าง ๆ อยู่ในปริมาณที่เข้มข้น เรียกว่า antiserum เมื่อนำน้ำเหลืองมาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า พบว่าอิมมูโนโกลบูลินส่วนใหญ่วิ่งไปสู่ขั้วประจุบวกได้ไม่ไกลนัก จึงอยู่ในส่วนของ gamma (γ) globulin โดยบางส่วนที่วิ่งไกลกว่าอาจจะอยู่ในส่วน beta (β) และ alpha (α) คนปกติมีปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินประมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนในน้ำเหลือง ส่วนผู้ที่กำลังมีการติดเชื้อหรือตอบสนองต่อแอนติเจนต่าง ๆ ระดับอิมมูโนโกลบูลินจะสูงขึ้น โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินประกอบด้วย heavy (H) chain และ light (L) chain โดยทั้ง 2 ส่วน ประกอบด้วยส่วน variable region และ constant region ช่องว่างระหว่าง variable region ของ heavy chain (V_H) กับ variable region ของ light chain (V_L) จะเป็นบริเวณที่รองรับสิ่งแปลกปลอมชนิดต่าง ๆ (antigen) โดยใน variable region นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนต่าง ๆ เพื่อให้เข้าได้กับสิ่งแปลกปลอมหลากหลายชนิด ซึ่งบน variable region มีส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงเพียง 6 บริเวณ คือ มี 3 บริเวณในส่วน V_H และอีก 3 บริเวณในส่วน V_L บริเวณดังกล่าว นั้นถูกเรียกว่า complimentary determining region (CDR) ดังนั้นจึงมี CDR1, 2 และ 3 ในแต่ละส่วน ดังแสดงในรูปที่ 1

ตารางที่ 1. แสดงลักษณะของ lymphoproliferative disorders ชนิดต่าง ๆ ⁽²⁾

	Leukemia	Lymphoma	Myeloma*
ลักษณะ	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนหรือตัวแก่ในไขกระดูกและในเลือด (peripheral blood)	พบเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผิดปกติในต่อมน้ำเหลือง	พบ plasma cells ที่มากกว่าปกติในไขกระดูก
เซลล์ที่เกิดโรค	Myelogenous or lymphocytic cells	Lymphocytic cells (Reed-Sternberg cells ใน Hodgkin lymphoma)	Plasma cells
ตำแหน่งที่เกิดโรค	ไปตามกระแสโลหิต สามารถผ่าน blood brain barrier เข้าสู่มองได้ในบางกรณี	อยู่ตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ตับ ม้าม ไขกระดูก แต่ไม่ออกมาในเลือด หากไม่เปลี่ยนแปลงเป็น leukemia	อยู่ในไขกระดูก หรือบางครั้งเกิดเป็นก้อนตามที่ต่าง ๆ เรียกว่า plasmacytoma

* ตารางนี้ใช้ myeloma เป็นตัวแทนของ plasma cell disorders



รูปที่ 1. แสดงลักษณะโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน ประกอบด้วย heavy (H) chain และ light (L) chain โดยทั้ง 2 ส่วน ประกอบด้วยส่วน variable region และ constant region ช่องว่างระหว่าง variable region ของ heavy chain (V_H) กับ variable region ของ light chain (V_L) จะเป็นบริเวณที่รองรับสิ่งแปลกปลอมชนิดต่าง ๆ

การตรวจหา paraprotein ทางห้องปฏิบัติการวิทยาภูมิคุ้มกัน

สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการตรวจหา paraprotein ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ 1) ซีรัม โดยเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำใส่หลอดเลือด ตั้งทิ้งไว้ 4 - 6 ชั่วโมง ทำการปั่นแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดด้วยความเร็วรอบ 3,000 - 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 - 15 นาที; 2) ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง โดยต้องมีกระบวนการในการทำให้ปัสสาวะเข้มข้นขึ้นประมาณ 4 เท่า ⁽⁴⁾

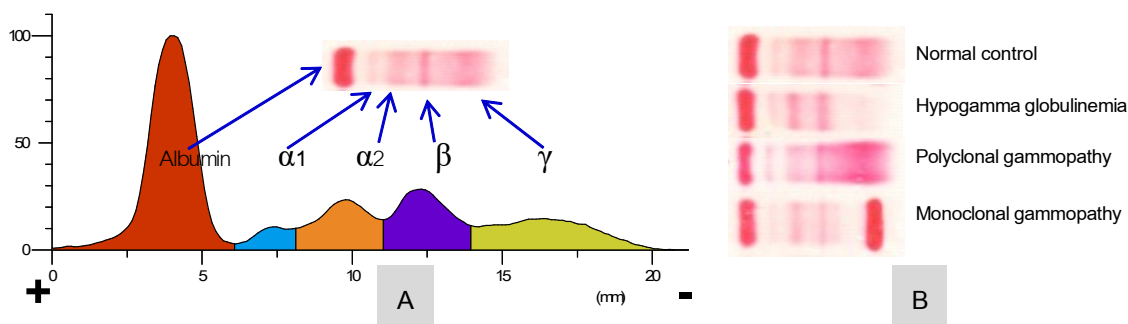
การตรวจคัดกรองอิมมูโนโกลบูลิน (screening test)

โดยมีจุดมุ่งหมายหลัก คือ การตรวจเพื่อดูว่าผู้ป่วยมีการสร้างอิมมูโนโกลบูลินผิดปกติหรือไม่

1. Agarose gel zone protein electrophoresis

คือวิธีการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าภายใต้หลักการว่าโปรตีนแต่ละชนิดมีประจุไฟฟ้าแตกต่างกัน โดย barbital buffer ทำหน้าที่เป็นตัวนำกระแสไฟฟ้าและรักษา

สภาวะ pH ของสารละลายให้เป็นค่าอยู่เสมอ ในสภาพสารละลายที่เป็นค่า โปรตีนทุกชนิดในซีรัมจะมีประจุลบ เมื่อผ่านไฟฟ้าลงไปในสารละลาย โปรตีนจึงเคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง (agarose gel หรือ cellulose acetate membrane) ไปยังขั้วบวก (anode) ระยะทางและความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับน้ำหนักของโมเลกุลและความแรงของประจุโปรตีนแต่ละชนิด ด้วยหลักการนี้โปรตีนในซีรัม จึงแยกตัวออกเป็น 5 ชนิด คือ albumin, α_1 globulin, α_2 globulin, β globulin และ γ globulin ตามลำดับ แถบของโปรตีนจะปรากฏขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการย้อมสี ดังแสดงในรูปที่ 2 การนำเครื่อง densitometers scan มาช่วยอ่านค่า ความเข้มของแต่ละแถบสี ทำให้สามารถทราบค่าความเข้มข้น (ร้อยละ) ของโปรตีน การอ่านผลการทดสอบวิธี agarose gel zone protein electrophoresis โดยดูความเข้มและความกว้างของแถบสีที่เกิดขึ้นในส่วนของ gamma-globulin zone เมื่อเทียบกับ normal control ดังแสดงในรูปที่ 2



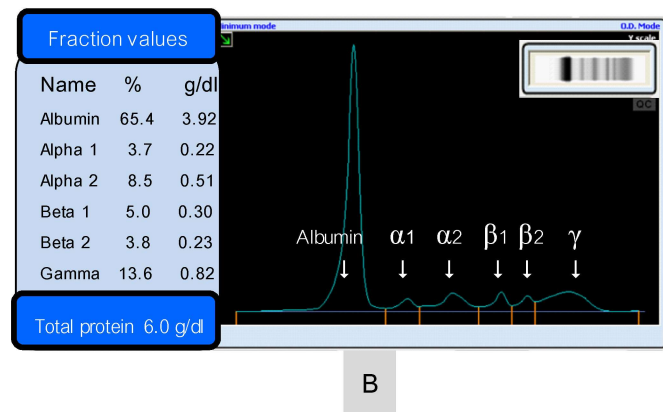
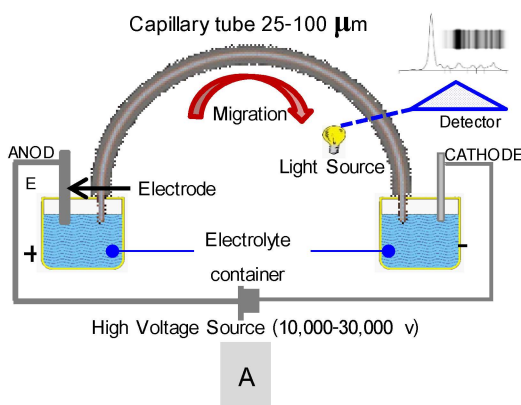
รูปที่ 2. แสดงผลการตรวจวิเคราะห์หาอิมมูโนโกลบูลินโดยหลักการ agarose gel zone protein electrophoresis: A) ระยะทางและความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กัน้ำหนักของโมเลกุลและความแรงของประจุโปรตีนแต่ละชนิด จึงแยกตัวออกเป็น 5 ชนิด คือ albumin, α_1 globulin, α_2 globulin, β globulin และ γ globulin ตามลำดับ; B) แสดงความเข้มของแถบสีในส่วนของ gamma-globulin zone

2. Capillary zone protein electrophoresis

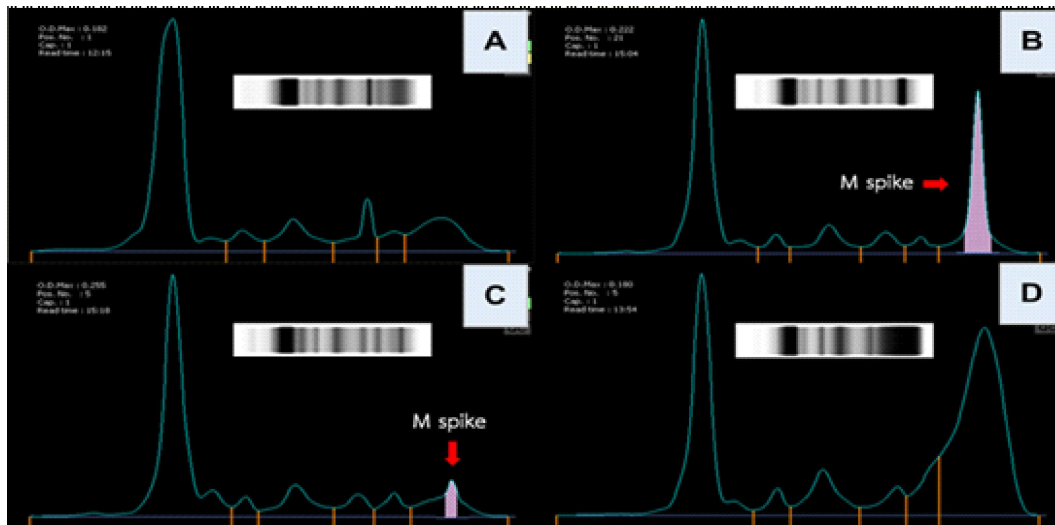
ปัจจุบันวิธีการทดสอบนี้เป็นที่นิยมมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่นำเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (automate) มาช่วยในตรวจวิเคราะห์ ทำให้ลดเวลาในการทดสอบ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ทั้งนี้ สามารถแยก Beta1 globulin กับ Beta2 globulin ได้ การตรวจโปรตีนในกระแสเลือดเรียกว่า serum protein electrophoresis (SPEP) และการตรวจโปรตีนในปัสสาวะจะเรียกว่า urine protein electrophoresis (UPEP) หลักการ capillary electrophoresis (CE) คือ การให้ศักย์ไฟฟ้าสูงตั้งแต่ 10,000 - 30,000 โวลต์ แก่หลอดรูเล็ก (capillary tube) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 - 100 μm ซึ่งภายในบรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และที่ปลายทั้งสองข้างของ capillary tube จุ่มอยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้า ทำให้ไอออนในสิ่งส่งตรวจวิ่งจากขั้วบวกไปยังขั้วลบตามแรงของ electro osmotic flow (EOF) จากนั้นโซนของสารที่แยกจากกัน และเคลื่อนที่ผ่าน detection window ซึ่งสัญญาณจาก detector จะส่งผ่านไปยัง data processor ผลที่ได้ออกมาเรียกว่า electropherogram สามารถแยกโปรตีนได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ albumin, α_1 globulin, α_2 globulin, β_1 globulin, β_2 globulin และ γ globulin เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติจะคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละแถบหน่วยเป็นร้อยละ หากต้องการทราบค่าความเข้มข้น (g/dl) โดยการนำค่าโปรตีนทั้งหมดมาคำนวณค่าความเข้มข้นของแต่ละแถบได้ดังแสดงในรูปที่ 3 electro osmotic flow (EOF) เป็นลักษณะ

เฉพาะของ capillary electrophoresis ซึ่งมีส่วนเพิ่มประสิทธิภาพในการแยก เนื่องจากลักษณะการไหลของ EOF เป็นแบบหน้าตัดเรียบ (flat flow profile) โซนของสารที่เกิดจากการแยกใน capillary electrophoresis จะแคบจึงทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการแยก (efficiency) ของโปรตีน

ความไว (sensitivity) ของ SPEP สามารถตรวจพบ paraprotein เมื่อผู้ป่วยมี paraprotein สูงกว่า 0.429 g/dl⁽⁵⁾ โดยจะพบลักษณะที่คล้ายหนามแหลมอันเป็นที่มาของคำว่า M spike โดยปกติสังเกตได้โดยเอาความสูงของกราฟหารด้วยความกว้างของกราฟได้เกินกว่า 3 เท่า อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยที่มี M protein ปริมาณต่ำ ๆ เช่น ผู้ป่วย Monoclonal gammopathies of uncertain significance (MGUS) อาจพบ M spike ที่เป็นรอยขยักใน gamma globulin zone เท่านั้น ในกรณีนี้ควรทำการตรวจวิเคราะห์ที่จำเพาะเพิ่ม เพื่อเป็นการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ต่อไป อนึ่ง แถบกราฟฐานแคบที่เกิดขึ้นในรูปแบบของ M spike นั้น เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติทางไฟฟ้าใกล้เคียงกัน อนุมานได้ว่าน่าจะมาจากเซลล์ที่ผิดปกติเพียงโคลนเดียว ภาวะนี้จะต้องแยกจาก polyclonal immunoglobulin ซึ่งมีลักษณะกราฟฐานกว้าง ดังแสดงในรูปที่ 4 โดยจะพบในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเรื้อรัง ได้รับวัคซีน หรือเป็นโรค autoimmune disease อนึ่งผู้ป่วยบางรายอาจมี polyclonal immunoglobulin ร่วมกับ monoclonal immunoglobulin ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ที่จำเพาะเพิ่มจะช่วยให้การวินิจฉัยผู้ป่วยได้



รูปที่ 3. แสดงการตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินโดยหลักการของ capillary zone protein electrophoresis: A) หลักการทำงานของ capillary zone protein electrophoresis; B) ผลการตรวจวิเคราะห์อิมมูโนโกลบูลิน โดยหลักการ capillary electrophoresis (CE)



รูปที่ 4. แสดงผลทางห้องปฏิบัติการของ serum protein electrophoresis (SPEP) ที่มี M spike ลักษณะต่าง ๆ: A) normal control; B) monoclonal immunoglobulin ที่มีปริมาณ M spike สูง; C) monoclonal immunoglobulin ที่มีปริมาณ M spike ต่ำ; D) polyclonal immunoglobulin

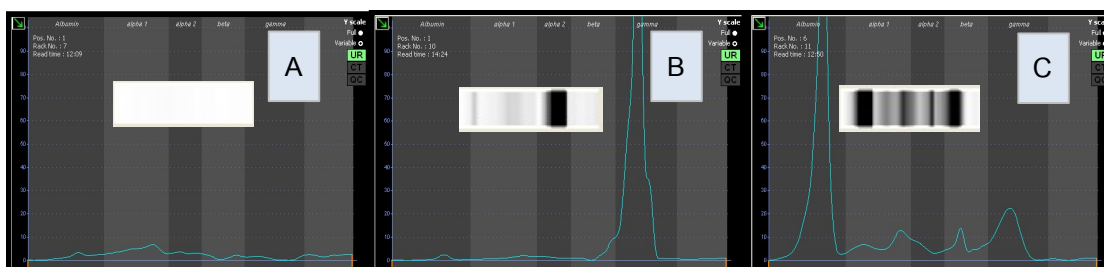
ส่วน UPEP สามารถตรวจพบ paraprotein ในปัสสาวะ เมื่อผู้ป่วยมี paraprotein ในปัสสาวะสูงกว่า 0.002 g/dl⁽⁴⁾ การตรวจ 24h UPEP เคยมีความสำคัญมากในการตรวจโรค light chain myeloma (เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Bence jone myeloma) ซึ่งพบประมาณ 15.0 ของผู้ป่วย myeloma ทั้งหมด การพบ paraprotein ซึ่งมักจะเป็น light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน เนื่องจากความไม่สะดวกในการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง การตรวจปัสสาวะที่ได้ครั้งแรกหลังตื่นนอน (first void urine) ก็อาจมีประโยชน์ในผู้ป่วยบางราย กล่าวคือ หากพบ M protein จะช่วยในการวินิจฉัยโรคได้แต่หากตรวจไม่พบอาจจะยังสรุปไม่ได้แน่ชัด ผู้ป่วยบางรายตรวจพบโปรตีนทั้ง 5 ชนิด แต่ไม่พบลักษณะ monoclonal protein ซึ่งบ่งบอกถึงพยาธิสภาพใน glomerulus และ renal tubule ดังแสดงในรูปที่ 5

การตรวจจำเพาะอิมมูโนโกลบูลิน (specific test)

โดยมีจุดมุ่งหมายหลัก คือ การตรวจเพื่อใช้ในการบอกลักษณะของ paraprotein

1. Immunoelectrophoresis (IEP)

เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อแยกชนิดของ paraprotein ปัจจุบันได้รับความนิยมน้อยลง เนื่องจากมีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน การเก็บรักษาผลการทดสอบยาก ความไวในการทดสอบน้อย โดยสามารถตรวจพบ paraprotein ได้เมื่อมีปริมาณมากกว่า 1 g/l ผลที่เกิดขึ้นบางครั้งดูยาก (low resolution) แต่มีข้อดีคือไม่เกิดปัญหา prozone phenomena เนื่องจากการ diffusion ผ่าน gel คล้ายกับเป็นการปรับอัตราส่วนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีอยู่แล้ว โดยแถบของอิมมูโนโกลบูลินจะเกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่พบกันปริมาณที่



รูปที่ 5. แสดงผลทางห้องปฏิบัติการของ urine capillary zone protein electrophoresis: A) Normal Control; B) ผู้ป่วยที่ตรวจพบ urine monoclonal protein; C) ผู้ป่วยตรวจพบโปรตีนทั้ง 5 ชนิดในปัสสาวะ

เหมาะสมโดยอัตโนมัติ การทดสอบนี้เทียบการเกิดแถบของอิมมูโนโกลบูลินระหว่างซีรัมคนปกติและซีรัมผู้ป่วย ดังแสดงในรูปที่ 6 โดยอาศัยหลักการ protein electrophoresis และ immunoprecipitation โดยเริ่มจากการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นใส่ anti-human antibody ซึ่งประกอบด้วย anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa chain และ anti-lambda chain ลงในช่องว่างระหว่างซีรัมคนปกติและซีรัมผู้ป่วย หลังจากการทำปฏิกิริยาประมาณ 12 ชั่วโมง จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดเป็น Ag-Ab complex และเกิดการตกตะกอน โดยสามารถอ่านผลการทดสอบเทียบกับซีรัมคนปกติ

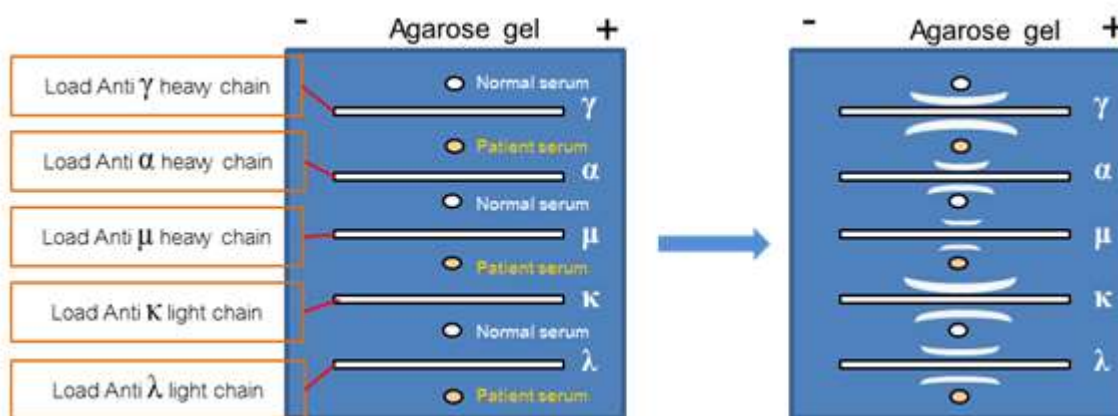
2. Immunofixation electrophoresis (IFE)

เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อแยกชนิดของ paraprotein ปัจจุบันวิธีการทดสอบนี้ได้รับความนิยมในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ เนื่องจากราคาค่อนข้างสูง การตรวจ IFE ทำได้รวดเร็วขึ้นโดยใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 2 ชั่วโมง การเก็บรักษาผลการทดสอบง่าย ดูผลได้ง่ายและมีความไวมากกว่าวิธี IEP การตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการ protein electrophoresis และ immunoprecipitation โดยเริ่มจากการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า เมื่อเติม anti-human antibody ที่จำเพาะ ซึ่งประกอบด้วย anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa chain และ anti-lambda chain จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดเป็น Ag-Ab complex และเกิดการตกตะกอน โดยจะมีการชะล้างส่วนของโปรตีนไม่เกี่ยวข้องออก และ Ag-Ab complex จะปรากฏให้เห็นเมื่อผ่านกระบวนการย้อมสี การตรวจ serum

Immunofixation electrophoresis (SIFE) สามารถตรวจพบ paraprotein เมื่อผู้ป่วยมี paraprotein สูงกว่า 0.03 g/l ⁽⁶⁾ และหากทำใน 24 hour urine (เรียกว่า UIFE) จะมีความไวมากขึ้นโดยสามารถพบ monoclonal immunoglobulin ได้ที่ระดับ 0.006 g/l ⁽⁷⁾ ตัวอย่างของผลการตรวจวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 7 ขอบเขต IFE คือ ผู้ป่วยที่พบ IgM monoclonal protein อาจจะไปยึดติดกับ gel มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยากับ anti-human antibody ทั้ง 5 ชนิด ควรดูผลการทดสอบอื่นๆ ประกอบ เช่น immunoglobulin levels, Immunotyping electrophoresis เป็นต้น

ในบางครั้งการตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี SPEP อาจเกิดความไม่แน่ใจ เนื่องจากแถบหรือโซนของการเกิดปฏิกิริยาไม่อยู่ในส่วนของ gamma zone ดังนั้นการส่งตรวจด้วยวิธี IFE ช่วยในการวินิจฉัยได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 8 อย่างไรก็ตามการทราบชนิดของอิมมูโนโกลบูลินของ paraprotein ไม่ได้มีส่วนช่วยในการรักษาผู้ป่วยมากเท่าใดนัก การพบว่ามี paraprotein โดย SPEP หรือ UPEP ที่มีราคาถูกกว่าก็มีความเพียงพอแล้วในการวินิจฉัยโรค ทำให้ในโรงพยาบาลทั่วไปไม่มีการตรวจวิเคราะห์ IFE

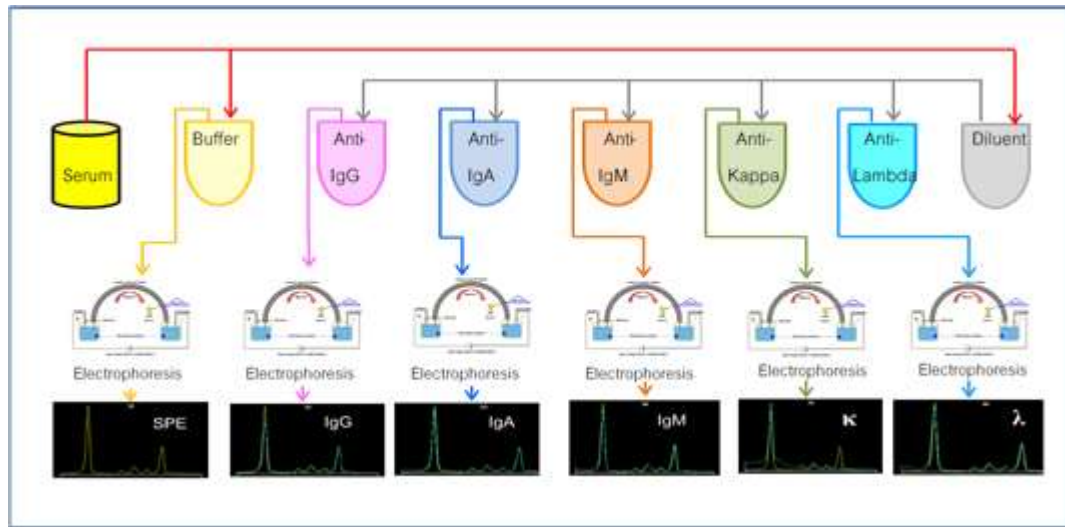
อนึ่งการตรวจวิเคราะห์หา IgD และ IgE นั้นจำเป็นจะต้องทำการตรวจพิเศษเพิ่มเติมโดยใช้ antibody ต่อ heavy chain ชนิด delta และ epsilon จึงสามารถพบแถบของโปรตีนได้ การวินิจฉัย light chain myeloma ด้วยวิธี IFE ต้องทำการแยกโรค IgD และ IgE myeloma ก่อน แต่เนื่องจากอัตราการเกิดโรค multiple myeloma ชนิด IgD และ IgE นั้นมีน้อยมากจึงมักจะไม่ได้ทำการตรวจในโรงพยาบาลทั่วไป



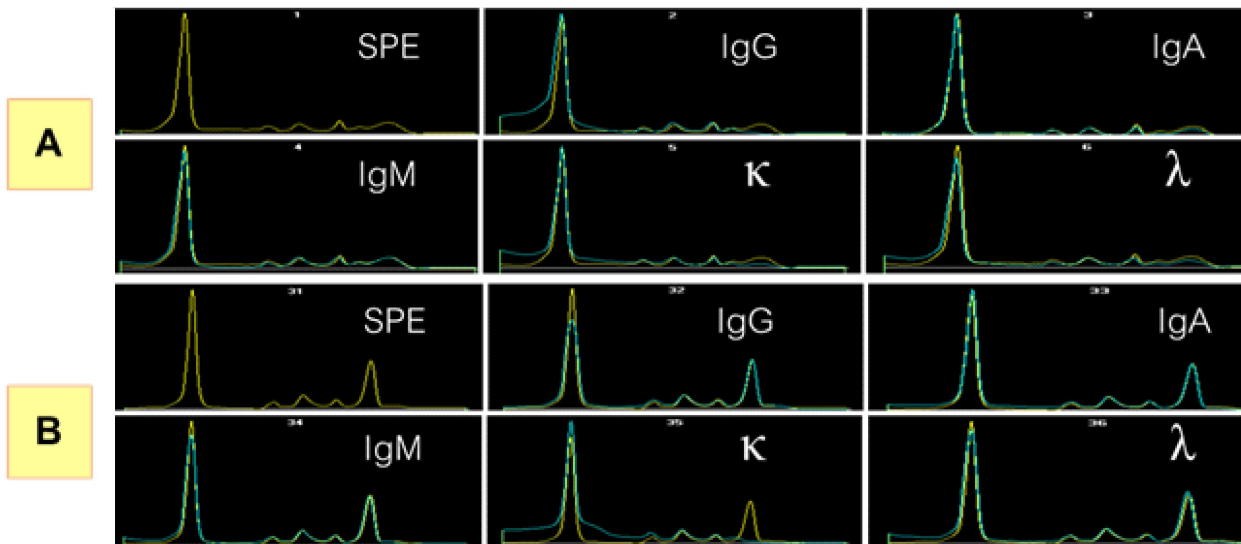
รูปที่ 6. แสดงการตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินด้วยหลักการ immunoelectrophoresis โดยใช้ agarose gel ด้านขวาแสดงแถบของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

ผลที่ได้ออกมาเรียกว่า electropherogram นำกราฟ SPE เปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงของกราฟ IgG, IgA, IgM, kappa chain และ lambda chain เพื่อดูว่า M spike นั้นหายไปหลังจากมีการเติมแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลิน ชนิดใด (รูปที่ 9 และ 10) การตรวจ serum immunotyping

electrophoresis (SIT) สามารถตรวจพบ paraprotein เมื่อผู้ป่วยมี paraprotein สูงกว่า 2.5 g/l ⁽⁸⁾ และหากทำใน 24 hour urine (เรียกว่า UIT) จะมีความไวมากขึ้นโดยสามารถ พบ paraprotein ได้ที่ระดับ 0.25 g/l ⁽⁸⁾



รูปที่ 9. แสดงขั้นตอนการตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินโดยหลักการ capillary immunotyping electrophoresis ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง human antibody (IgG, IgA, IgM, kappa chain และ lambda chain) กับ anti-human antibody



รูปที่ 10. แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ capillary immunotyping electrophoresis โดยเส้นกราฟสีเหลืองเป็นผลจากการทำ electrophoresis ส่วนเส้นกราฟสีน้ำเงินเป็นผลจากการทำ electrophoresis หลังจากใส่แอนติบอดีต่อส่วน heavy chain และต่อส่วน light chain จากรูป A) normal control serum; B) free kappa monoclonal protein

การหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน (quantitative test)

1. Radial immunodiffusion (RID) หรือวิธีของ Mancini หรือ single diffusion in two dimensions

เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในสิ่งส่งตรวจ ปัจจุบันวิธีการทดสอบนี้ได้รับความนิยมน้อยเนื่องจากมีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ไม่เหมาะกับงานที่มีปริมาณมาก หลักการทดสอบนี้อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในตัวกลางที่เป็นวุ้น โดยการใช้แอนติบอดีผสมในวุ้นจากนั้นเจาะหลุมในวุ้นที่ผสมแอนติบอดีสำหรับใส่แอนติเจน แอนติเจนจะกระจายออกโดยรอบเป็นวงทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในวุ้น ทำให้เกิดเส้นตะกอนเป็นวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางของวงตะกอน จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่อยู่ในหลุมนั้น โดยการเปรียบเทียบกับแอนติเจนที่รู้ปริมาณ 3 ระดับ จะทำให้ทราบปริมาณของตัวอย่างที่นำมาหาได้โดยการกราฟที่ได้จาก standard 3 จุด ดังแสดงในรูปที่ 11 วิธีการทดสอบนี้ใช้ตรวจหาปริมาณของ immunoglobulin, complement, C reactive protein เป็นต้น

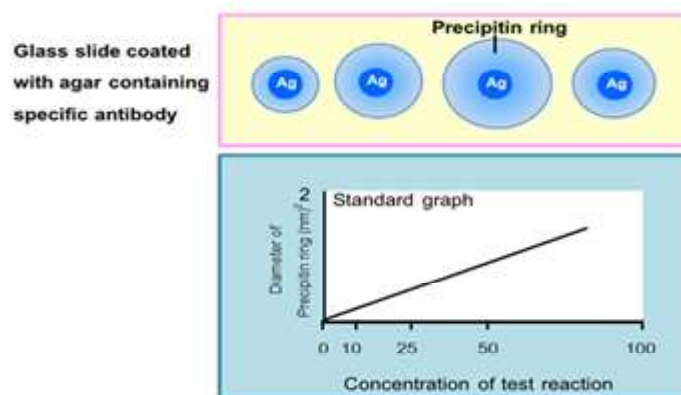
2. Immunoturbidimetric method

เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในสิ่งส่งตรวจ หลักการทดสอบนี้สามารถบอกปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินได้ โดยการใส่แอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดนั้น ๆ ลงไปในตัวอย่าง เกิดเป็น antigen-antibody complex (immune complexes) เมื่อยิงลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ผ่าน immune complexes นี้จะเกิดความเข้มของแสง โดยความเข้มของแสงจะถูกนำไปเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 12

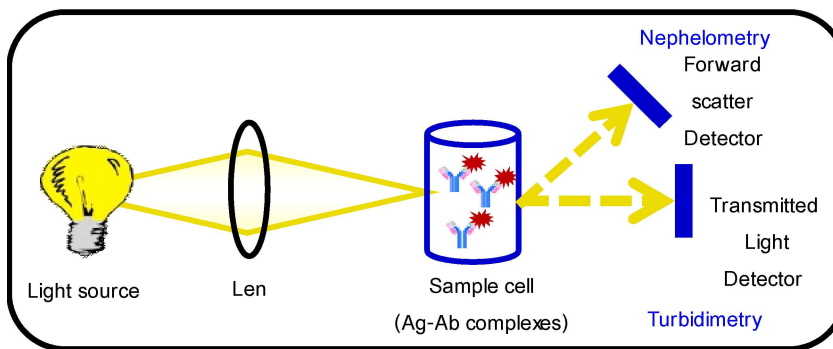
3. Immunonephelometric method

เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในสิ่งส่งตรวจ หลักการทดสอบนี้สามารถบอกปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินได้ โดยการใส่แอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดนั้น ๆ ลงไปในสิ่งส่งตรวจ เกิดเป็น antigen-antibody complex (immune complexes) เมื่อยิงแสงจากแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ light emitting diode (LED) ผ่าน immune complexes นี้จะเกิดการกระเจิงของแสง ความเข้มของแสงที่กระเจิงออกมาจะถูกนำไปเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน โดยความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินในสิ่งส่งตรวจ ดังแสดงในรูปที่ 12

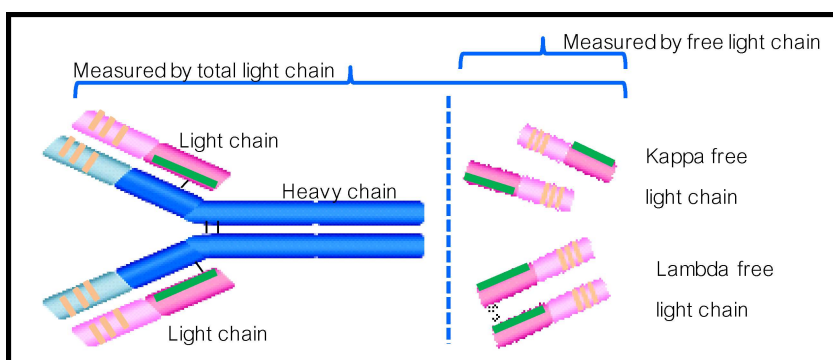
หลักการทดสอบ immunoturbidimetric method และ immunonephelometric method สามารถทำให้มีความไวสูงขึ้นได้โดยการนำแอนติบอดีเคลือบบน inert particles (โดยปกตินิยมใช้สารสังเคราะห์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ polystyrene latex เรียกว่า latex particles) ทำให้แอนติบอดีที่จะใส่เข้าไปนั้นมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเกิด antigen-antibody complex ก็จะมีขนาดใหญ่และเกิดแสงมากขึ้น ปัจจุบันวิธีการทดสอบนี้ได้รับความนิยมในห้องปฏิบัติการเนื่องจากวิธีการทดสอบทำได้รวดเร็วโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (automate) ใช้ในการหาโปรตีนได้หลายชนิด วิธีนี้สามารถบอกปริมาณ intact immunoglobulin โดยใช้แอนติบอดีต่อส่วนของ heavy chain และใช้แอนติบอดีต่อส่วนของ light chain เพื่อตรวจ total light chain หรืออาจใช้แอนติบอดีต่อส่วน epitope ของ light chain ชนิด K หรือ λ ที่โดยปกติถูกบดบังด้วย heavy chain (conceal epitope) antibody ต่อ conceal epitope นั้นจะจับกันได้ก็ต่อเมื่อไม่มี heavy chain อยู่ กล่าวคือเป็น free light chain ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 11. แสดงการตรวจหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลินโดยหลักการ Radial Immunodiffusion (RID)



รูปที่ 12. แสดงการตรวจหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลินโดยหลักการ immunoturbidimetric method และหลักการ immunonephelometric method



รูปที่ 13. แสดงแอนติบอดีต่อ bound light chain ในการตรวจ total light chain นั้นสามารถเกาะกับ epitope ที่เป็นส่วนนอกของอิมมูโนโกลบูลิน (บริเวณที่เป็นสี่เหลี่ยมของ light chain) ในขณะที่แอนติบอดีต่อ free light chain นั้นสามารถเกาะกับ epitope ที่ซ่อนอยู่ในส่วนใน (บริเวณที่เป็นสี่เหลี่ยมของ light chain) ทำให้สามารถเลือกทำปฏิกิริยาเฉพาะ free light chain

การตรวจ light chain สามารถตรวจในรูปแบบ free form^(9, 10) และ bound form โดย serum free light chain (sFLC) สามารถตรวจพบได้ในระดับ 0.4 mg/l ส่วน bound light chain สามารถตรวจพบได้ในระดับ 3,000 mg/l ดังนั้นการตรวจ sFLC จึงเป็นการตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินที่มีความไวสูงที่สุดในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการตรวจวัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี turbidimetry หรือ nephelometry นั้นไม่สามารถรู้ได้อย่างชัดเจนว่าอิมมูโนโกลบูลินนั้นมีลักษณะที่เป็น “monoclonal” โดยเฉพาะอย่างยิ่ง intact immunoglobulin ซึ่งสร้างขึ้นอย่างสม่ำเสมอในภาวะปกติ แต่หากอิมมูโนโกลบูลินที่วัดได้นั้นมีค่าสูงกว่าปกติอย่างมากก็อาจจะอนุมานว่าเป็น monoclonal protein โดยที่ไม่ได้เห็น รูปร่าง หน้าตา ของโปรตีนจาก electrophoresis เช่น หาก มี IgA สูง 10 g/l อาจอนุมานได้เลยว่า เป็น IgA myeloma ในกรณีของค่า free light chain นั้นในคนปกติมีค่า ประมาณ 500 mg ต่อวัน เนื่องจากการผลิตอิมมูโนโกลบูลิน นั้นมีการสร้าง light chain และ heavy chain แยกกันโดยมีการสร้าง light chain มากกว่า heavy chain

เมื่อเกิดการจับคู่กันเพื่อให้เกิดอิมมูโนโกลบูลินแล้วจึงมี light chain ที่เป็น free form เหลืออยู่บ้างในภาวะปกติพบว่าการมี serum free light chain (sFLC) มากกว่า 100 mg/l น่าจะเกิดความผิดปกติบางอย่างขึ้นกับเซลล์ที่ผลิตอิมมูโนโกลบูลิน แต่ยังไม่เพียงพอที่จะบ่งบอกความเป็น monoclonal ของ sFLC จึงได้มีการเทียบอัตราส่วนของ K/ λ ซึ่งปกติมีค่า 0.26 - 1.65 หากอัตราส่วนดังกล่าวต่างจากปกติมากจะยิ่งช่วยบ่งบอกว่าเกิดความผิดปกติบางอย่างขึ้นกับเซลล์ที่ผลิต ในคนปกติมีการสร้าง K มากกว่า λ light chain ในระดับ 2:1 แต่เนื่องจาก K light chain มักจะไม่มี การรวมตัวกันเป็น dimer ต่างจาก λ light chain ทำให้ K light chain ถูกขับออกทางปัสสาวะมากกว่าส่งผลให้อัตราส่วนของ K/ λ ประมาณ 0.59 (0.26 - 1.65) ในภาวะที่ไตปกติ ทั้งที่มีการผลิต K light chain มากกว่า ดังนั้นค่า K/ λ อาจสูงขึ้นอยู่ที่ประมาณ 0.37 - 3.10 ในกรณีที่ไตทำงานผิดปกติ เนื่องจากการขับออกทางปัสสาวะ ของ K light chain ที่ลดน้อยลง

สรุป

ในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกที่สงสัยว่ามี paraprotein การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่มีเป้าหมายเพื่อพิสูจน์ว่ามีการเกิด monoclonal immunoglobulin ที่สำคัญที่สุด ได้แก่ SPEP และ UPEP ส่วนการตรวจเพื่อดูว่า เป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิดใดด้วยวิธี IEP, IFE หรือ IT นั้นอาจส่งตรวจวิเคราะห์ในบางสถาบันที่สามารถทำได้แต่ไม่มีความจำเป็นมากนัก ส่วนในการติดตามการรักษานิยมใช้ sFLC และใช้ SPEP หรือ UPEP ในกรณีที่ไม่สามารถใช้ sFLC ได้ ส่วนการหาระดับอิมมูโนโกลบูลินนั้นอาจใช้ด้วยเหตุผลเฉพาะรายเท่านั้น เช่น ติดตามดูปริมาณ IgG ในผู้ป่วย IgA myeloma เพื่อติดตามความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Cook L, Macdonald DH. Management of paraproteinaemia. *Postgrad Med J* 2007;83:217-23.
2. อัมภาส ลิฬหนิชกุล. โรคที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมากผิดปกติ. ใน: ดิเรกฤทธิ์ เชี่ยวเชิงชล, บรรณาธิการ. ภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2559. หน้า 350.
3. อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์. อิมมูโนโกลบูลิน. ใน: อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, บรรณาธิการ. วิทยาภูมิคุ้มกันพื้นฐานและคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2552. หน้า 85 - 6.
4. Le Bricon T. Identification et dosage des proteines urinaires au laboratoire d'analyses. *Annales de Biologie Clinique* 2002;60:525-40.
5. Henskens Y, Winter J, Pekelharing M, Ponjee G. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 1998;44:1184-90.
6. Alper CA, Johnson AM. Immunofixation electrophoresis: A technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sang* 1969;17:445-52.
7. Ritchie RF, Smith R. Immunofixation. III. Application to the study of monoclonal proteins. *Clin Chem* 1976; 22:1982-5.
8. Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P, Le Carrer D, Benlakehal M, Bousquet B, et al. Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. *Clin Chem* 2003;49:1909-15.
9. Davids MS, Murali MR, Kuter DJ. Serum free light chain analysis. *Am J Hematol* 2010;85:787-90.
10. Mayo MM, Johns GS. Serum free light chains in the diagnosis and monitoring of patients with plasma cell dyscrasias. *Contrib Nephrol* 2007;153:44-65.