

Review article

Detection of antinuclear antibodies in laboratory

Niramol Thammacharoenrach^{1,*}, Yadah Kaewopas²

¹*Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand*

²*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

Abstract

Antinuclear antibodies (ANA) are autoantibodies against different components of nuclear structures that are important for serological diagnosis and monitoring of systemic autoimmune diseases (SAIDs), which include systemic lupus erythematosus (SLE), mixed connective tissue disease (MCTD), systemic sclerosis (SSC) and rheumatoid arthritis (RA), etc. There are two methods of ANA testing, namely: 1) screening tests which are commonly used indirect immunofluorescence (IIF) on HEp-2 cell (human epithelial cell tumor line) that identifies the patterns of autoantibody against different cell structures, and enzyme immunoassay (EIA) which is a qualitative measurement; and 2) specific antibodies test; including EIA that can detect only one specific antibody or detect multiple antibodies that are associate with the disease of interest, while multiplex immunoassay (MIA) can detect multiple antibodies at a time. To date, IIF is a gold standard screening test for ANA detection with a recent consensus nomenclature of HEp-2 IIF patterns by the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) which is characterized by alphanumeric AC (Anti-cell) codes (AC 0-29). The relevant interpretation of HEp-2 IIF patterns depends on expert visualization, while EIA and MIA techniques can use automated machines with high sensitivity and specificity. In conclusion, this review focuses on updating the detection of ANA commonly used in laboratories that will be widely beneficial for medical personnel.

Keywords: Antinuclear antibodies, autoantibodies, enzyme immunoassay, indirect immunofluorescence, multiplex immunoassay.

***Correspondence to:** Niramol Thammacharoenrach, Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.

E-mail: Ni.tham75@gmail.com

Received: March 3, 2022

Revised: May 24, 2022

Accepted: June 20, 2022

บทฟื้นฟูวิชาการ

การตรวจหาแอนติบอดีต่อนิวเคลียส ทางห้องปฏิบัติการ

นิรมล ธรรมมาเจริญราช¹, ญาดา แก้วโอภาส²

¹ฝ่ายจุลชีววิทยา, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, สภากาชาดไทย

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

แอนติบอดีต่อนิวเคลียส คือ แอนติบอดีต่อส่วนประกอบต่าง ๆ ของนิวเคลียสในเซลล์ของตัวเอง ซึ่งมีความสำคัญต่อการตรวจวินิจฉัยและติดตามรักษาในกลุ่มโรค systemic autoimmune diseases (SAIDs) เช่น systemic lupus erythematosus (SLE), mixed connective tissue disease (MCTD), systemic sclerosis (SSC) และ rheumatoid arthritis (RA) เป็นต้น การตรวจวิเคราะห์ ANA ทางห้องปฏิบัติการ สามารถตรวจได้ 2 รูปแบบ คือ 1) การตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening test) หลักการที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ Indirect immunofluorescence (IIF) ใช้เซลล์ HEp-2 (human epithelial cell tumor line) ซึ่งสามารถระบุรูปแบบของออโตแอนติบอดีต่อตำแหน่งต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ และหลักการ Enzyme immunoassay (EIA) แสดงผลเชิงคุณภาพ 2) การตรวจแบบจำเพาะ (specific antibodies test) ได้แก่ หลักการ EIA ที่สามารถเลือกตรวจแอนติบอดีชนิดใดชนิดหนึ่งหรือเลือกตรวจชุดแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องกับโรคที่สนใจได้ ในขณะที่หลักการ Multiplex immunoassay (MIA) สามารถตรวจหาแอนติบอดีหลายชนิดได้พร้อมกัน ปัจจุบันเทคนิค IIF เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจคัดกรอง ANA เบื้องต้น โดยคณะกรรมการ International Consensus on ANA Patterns (ICAP) มีหน้าที่กำหนดชื่อรูปแบบการเรืองแสง HEp-2 IIF ระบุลักษณะเฉพาะด้วยรหัส Anti-cell (AC) เป็นตัวอักษรและตัวเลข (AC 0-29) ซึ่งการอ่านผลที่เกี่ยวข้องกับรูปแบบ HEp-2 IIF นั้น ต้องอาศัยบุคลากรที่ชำนาญ ในขณะที่เทคนิค EIA และ MIA สามารถใช้เครื่องอัตโนมัติในการตรวจวิเคราะห์ มีความไวและความจำเพาะสูง โดยสรุปบทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทบทวนวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อนิวเคลียสที่นิยมใช้ทางห้องปฏิบัติการให้เป็นปัจจุบัน เพื่อประโยชน์ในวงกว้างสำหรับบุคลากรทางการแพทย์

คำสำคัญ: แอนติบอดีต่อนิวเคลียส, แอนติบอดีต่อตัวเอง, enzyme immunoassay, indirect immunofluorescence, multiplex immunoassay.

การตรวจหาแอนติบอดีต่อนิวเคลียส (Antinuclear antibodies-ANA) มีความสำคัญต่อการตรวจวินิจฉัยโรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเองต่าง ๆ ในกลุ่ม systemic autoimmune disease (SAIDs) ได้แก่ systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome, mixed connective tissue disease (MCTD), systemic sclerosis (SSC) และ rheumatoid arthritis (RA) เป็นต้น⁽¹⁻³⁾ ผู้ป่วย SLE ที่ยังไม่ได้รับการรักษา มีโอกาสตรวจพบ ANA มากกว่าร้อยละ 95 แต่ ANA ไม่มีความจำเพาะต่อโรคใดโรคหนึ่ง เนื่องจากสามารถตรวจพบในโรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อตนเองชนิดอื่น ๆ ได้ โดยในแต่ละโรคมีอัตราการตรวจพบ ANA ที่แตกต่างกัน รวมทั้งสามารถพบได้ในคนปกติ ดังแสดงในตารางที่ 1 ในช่วงแรก ANA หมายถึงกลุ่มแอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ๆ เฉพาะภายในส่วนของนิวเคลียสเท่านั้น แต่หลังจากมีการตรวจด้วยวิธี IIF เรื่อยมา จึงถือรวมแอนติบอดีต่อองค์ประกอบของเซลล์ที่อยู่ในส่วนไซโตพลาสซึมเป็นหนึ่งใน การตรวจ ANA ด้วยเช่นกัน ดังนั้นการตรวจหา ANA จึงสามารถแบ่งตามแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมได้ 4 กลุ่ม⁽⁴⁾ ดังนี้

1. แอนติบอดีต่อส่วนกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ได้แก่ แอนติบอดีต่อส่วนแอนติเจนบนกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Anti-double stranded: Anti-dsDNA หรือ single- stranded DNA: Anti-ssDNA)
2. แอนติบอดีต่อโปรตีนเบสในนิวเคลียส (Basic nuclear proteins) ได้แก่ แอนติบอดีต่อโปรตีนฮิสโตน (Histones)
3. แอนติบอดีต่อโปรตีนกรดในนิวเคลียส (Acidic nuclear proteins) เป็นแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ไม่ใช่ฮิสโตน (Non-histone protein) หรือโปรตีนที่สามารถสกัดได้ด้วยน้ำเกลือ หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปัจจุบันเรียกโปรตีนกลุ่มนี้ว่า "Extractable nuclear antigens (ENAs)" ได้แก่ Anti-Sm, Anti-SSA/Ro, Anti-SSB/La, Anti-RNP, Anti-Sc170, Anti-centromere และ Anti PM-Scl เป็นต้น
4. แอนติบอดีต่อส่วนไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic components) ได้แก่ Anti-mitochondria, AntiJo-1, Anti-Ribosomal P protein และ Anti-Actin เป็นต้น

การตรวจหา Antinuclear antibodies (ANA)

สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการตรวจหา Antinuclear Antibodies (ANA) ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ซีรัม หรือ พลาสมา

สามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลากหลายวิธี ได้แก่ การตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening test) เช่น เทคนิค Indirect Immunofluorescence (IIF) และ Enzyme immunoassay (EIA) ส่วนการตรวจแบบจำเพาะ (specific antibodies test) เช่น เทคนิค EIA และ Multiplex immunoassay (MIA) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกัน อยู่ที่ความเหมาะสมในการเลือกใช้

Indirect Immunofluorescence (IIF) Assay หรือ Fluorescent antinuclear antibody (FANA) test

การตรวจวิเคราะห์หา ANA ด้วยหลักการ IIF เป็นการตรวจเบื้องต้น (Screening test) สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วนประกอบของนิวเคลียสหลายชนิด ได้แก่ กรดนิวคลีอิก ส่วนประกอบของโปรตีนในนิวเคลียสและส่วนประกอบในไซโตพลาสซึม เซลล์ตั้งต้นที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ HEp-2 cell (Human Epithelial cell จาก laryngeal carcinoma) เนื่องจากนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ เพาะเลี้ยงบนแผ่นกระจก และสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะต่างกันได้ จึงสามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่แสดงออกในบางช่วงเวลา (cell-cycle) ที่ต่างกัน จากการที่ HEp-2 cell มีโครงสร้างภายในเซลล์ที่เด่นชัด ทำให้ตรวจพบ ANA ที่มีความหลากหลายมากขึ้นทั้งแอนติบอดีต่อส่วนของ nucleoplasm, nucleoli, nuclear membrane, mitochondria, Golgi apparatus และ cytoskeleton fiber เป็นต้น จนได้มีการเสนอชื่อที่เหมาะสมเป็น anti-cellular antibodies และทางกลุ่ม American College of Rheumatology (ACR) ถือว่าเทคนิค indirect immunofluorescence (IIF) เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard)^(5,6) ในการตรวจวิเคราะห์หา ANA หลักการ IIF คือการทดสอบโดยใช้ น้ำเหลืองที่เจือจางเริ่มที่ 1:40 หรือ 1:80 หรือ 1:160 (ขึ้นอยู่กับแต่ละห้องปฏิบัติการ) ลงบน HEp-2 cell หรือรูปแบบอื่นเช่น HEp-2000 (HEp-2 cell ที่ใส่ SS-A cDNA)^(8,9) นำยาบางผลิตภัณฑ์เพิ่มเนื้อเยื่ออื่น เช่น primate liver เป็นสับสเตรตอีกชนิด เพื่อช่วยสนับสนุนรูปแบบการเรืองแสง (pattern) ควบคู่ไปกับ HEp-2 cell (บางแอนติบอดีที่จำเพาะ หรือบาง pattern จะเห็นได้ชัดเจนใน primate liver เช่น Anti-Ku, Nuclear envelope เป็นต้น) หลังทำปฏิกิริยาและล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกแล้วเติม Fluorescence-conjugated anti-human IgG สำหรับตรวจติดตามปฏิกิริยา อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) โดยดูการ

เรืองแสงในนิวเคลียสและบริเวณอื่น ๆ ทั่วเซลล์ ในรายที่ให้ผลบวกจะต้องเจือจางน้ำเหลืองต่อไปจนถึงไตเตอร์สูงสุดท้ายนี้เพื่อทราบระดับไตเตอร์แล้ว ยังทำให้สามารถเห็นบางรูปแบบที่ติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่ถูกบดบังด้วยรูปแบบอื่นที่มีความเข้มของการเรืองแสงสูงในน้ำเหลืองที่ความเจือจางต่ำ ๆ ได้ สำหรับในกรณีนี้ ANA ให้ผลลบโดยวิธี IIF แต่ข้อมูลทางคลินิกบ่งชี้ว่ามีความน่าจะเป็นกลุ่มโรค systemic autoimmune rheumatic diseases อาจต้องใช้วิธีการอื่นในการตรวจ เนื่องจาก HEp-2 cell มีแอนติเจน SS-A /Ro ต่ำ จึงใช้ HEp-2 cell ที่มีการ transfect SSA (60kDa) (HEp-2000) เข้าไปเพื่อให้ความไว (sensitivity) สูงขึ้น หรือใช้หลักการอื่นในการตรวจหา anti-SS-A/Ro⁽¹⁰⁾ จากการใช้เทคนิค IIF สามารถระบุรูปแบบการเรืองแสง จึงมีประโยชน์ในการคาดคะเนแอนติเจนที่จำเพาะได้

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบปฏิบัติการอัตโนมัติประกอบไปด้วย เครื่องอัตโนมัติสำหรับทำการทดสอบ, กล้องฟลูออเรสเซนต์อัตโนมัติและโปรแกรมในการวิเคราะห์ผล

การทดสอบ มาช่วยในการทดสอบ โดยสามารถแสดงผลเชิงคุณภาพ คือ บวก, ลบ และก้ำกึ่ง (positive, negative, borderline) ระดับไตเตอร์และรูปแบบการเรืองแสง ซึ่งพบว่าเครื่องอัตโนมัติมีประสิทธิภาพดีในการแปลผลการทดสอบเชิงคุณภาพ, ระดับไตเตอร์ที่ ± 1 ไตเตอร์และรูปแบบการเรืองแสงรูปแบบหลัก ๆ เช่น Homogeneous, Speckled, Nucleolar และ Nuclear dot เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1 เครื่องอัตโนมัติดังกล่าวสามารถทำการทดสอบตัวอย่างที่มีปริมาณมาก ทดแทนจำนวนบุคลากรที่มีความชำนาญได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในการอ่านรูปแบบการเรืองแสง ซึ่งบางรูปแบบเครื่องอัตโนมัติไม่สามารถอ่านได้ เช่น Dense fine speckled, Fine speckled, Large speckled และ PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการอ่านผลการทดสอบยังคงต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญมายืนยันผลการทดสอบอีกครั้ง คาดว่าในอนาคตเครื่องอัตโนมัติสามารถพัฒนาประสิทธิภาพการอ่านผลการทดสอบ ANA ได้แม่นยำยิ่งขึ้น^(5, 11 - 14)

ตารางที่ 1. อัตราการตรวจพบ ANA ในโรคต่าง ๆ รวมทั้งคนปกติ⁽⁷⁾

โรค	อัตราการตรวจพบ (ร้อยละ)
Systemic lupus erythematosus (SLE)	95.0 - 100.0
Systemic sclerosis (scleroderma)	60.0 - 80.0
SjÖgren's syndrome	40.0 - 70.0
Idiopathic inflammatory myositis	30.0 - 80.0
Juvenile chronic arthritis	20.0 - 50.0
Raynaud's phenomenon	20.0 - 60.0
Drug-induced SLE	~100.0
Autoimmune hepatic disease	~100.0
Mixed connective tissue disease	~100.0
Rheumatoid arthritis	30.0 - 50.0
Multiple sclerosis	25.0
Idiopathic thrombocytopenic purpura	10.0 - 30.0
Thyroid disease	30.0 - 50.0
Discoid lupus	5.0 - 25.0
Infectious disease	Varies widely
Malignancies	Varies widely
Patients with silicone breast implants	15.0 - 25.0
Fibromyalgia	15.0 - 25.0
คนปกติ : สามารถตรวจพบ ANA ที่ระดับไตเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่	
$\geq 1:40$	20.0 - 30.0
$\geq 1:80$	10.0 - 12.0
$\geq 1:160$	5.0
$\geq 1:320$	3.0

The screenshot displays the EUROPattern Suite software interface. On the left, there are four fluorescence microscopy images of Hep-20-10 cells at different dilutions: 1:80 - Hep-20-10 Cells, 1:640 - Hep-20-10 Cells, 1:80 - Liver, and 1:640 - Liver. The main window shows the 'Result of computer' as Homogeneous 1:640 (82%) and 'Visual microscopic result' as Homogeneous 1:640, Speckled 1:640, and Nucleolar 1:640. The 'End result' is Homogeneous 1:640, Speckled 1:640, and Nucleolar 1:640. The interface also includes a 'Classify' section with various patterns like Homogeneous, Speckled, Nucleolar, etc., and a 'Further...' section with options like Negative <1:80, Varying reactivity of fine..., etc.

รูปที่ 1. ผลการตรวจวิเคราะห์ ANA (IIF) โดยการใช้ EUROPattern Suite (Euroimmun, Lübeck, Germany) ที่ประกอบไปด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์อัตโนมัติ, โปรแกรมในการวิเคราะห์ผลการทดสอบ (แสดงรูปภาพ, รูปแบบการเรียงแสง, ระดับไตเตอร์และร้อยละ ความเข้มข้นของแต่ละรูปแบบ) โดยวิเคราะห์จากการจัดจ้าน้ำเหลืองที่ 1:80 และ 1:640

จากที่ ANA patterns มีมากมายหลายรูปแบบ ในช่วงปี พ.ศ. 2557 – 2558 มีการก่อตั้ง International Consensus on ANA Patterns (ICAP) เพื่อกำหนดรูปแบบการอ่านผล ANA patterns โดยระบุลำดับ Anti-cell (AC) ตั้งแต่ AC-1 ถึง AC-29 ให้เป็นมาตรฐาน^(15, 16) ดังแสดงในแผนผังรูปที่ 2 ที่แสดงระดับความสามารถในการอ่าน HEp-2 patterns ด้วย⁽¹⁷⁾ รวมทั้งรูปภาพการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ใน HEp-2 cell ดังแสดงในรูปที่ 3

ทาง ICAP ได้แบ่งรูปแบบ AC-4 (fine speckled nuclear pattern) ออกเป็น AC-4a และ AC-4b ดังแสดงในรูปที่ 4 รูปแบบ fine speckled (AC-4) มีความเกี่ยวข้องกับ Anti-SS-A/Ro, Anti-SS-B/La และขอได้แอนติบอดีตัวอื่นอีกซึ่ง Anti-SS-A/Ro ประกอบด้วย Ro60 และ Ro52 มีรายงานพบว่ารูปแบบ AC-4a มีความเกี่ยวข้องกับ Anti-SS-A/Ro60 ในขณะที่รูปแบบ AC-4b ไม่มีความเกี่ยวข้องกับ Anti-SS-A/Ro⁽¹⁷⁾ ดังนั้นรูปแบบการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ในนิวเคลียสจึงมีความสัมพันธ์กับแอนติเจนและโรคที่เกี่ยวข้อง ดังแสดงในตารางที่ 2

Enzyme immunoassay (EIA)

ปัจจุบันจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจ ANA เพิ่มขึ้น ห้องปฏิบัติการจึงนิยมใช้เทคนิค EIA ในการตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening test) และการตรวจแบบจำเพาะ (specific antibodies test) เนื่องจากสะดวกและตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติได้ โดยทั่วไปใช้หลักการ indirect ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ในกรณีที่เป็น การตรวจคัดกรองเบื้องต้น จะเคลือบ solid phase ด้วยสารสกัดจาก HEp-2 cell หรือ recombinant protein หลายชนิดร่วมกัน ตรวจติดตามปฏิกิริยาด้วย conjugated anti-human immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ วัดผลเชิงคุณภาพ (บวก/ลบ) มีความไวสูง จึงพบปัญหาผลบวกเทียม ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้หลักการ ELISA ไว้สำหรับตรวจคัดกรอง ANA ที่ให้ผลลบ แต่ถ้าผลบวกจำเป็นต้องตรวจยืนยันโดยใช้หลักการ IIF⁽¹⁹⁾ จากการที่วิธี EIA มีจำนวนแอนติเจนที่เคลือบบน solid phase ไม่เหมือนกับการใช้เซลล์ HEp-2 จึงมีรายงานการเปรียบเทียบการทดสอบ ANA ระหว่างวิธี IIF และ solid phase immunoassay ในตัวอย่างเดียวกันพบว่า IIF มีความไวสูงกว่า ในขณะที่ความจำเพาะต่ำกว่า^(20, 21) ดังนั้นจึงเพิ่มจำนวนแอนติเจนใน EIA ให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มความไวให้สูงขึ้น ข้อดีของวิธี EIA คือสามารถตรวจแอนติบอดี

ชนิด IgG, IgM หรือ IgA ได้ นอกจากนี้วิธี EIA ยังนิยมใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น แอนติบอดีต่อ dsDNA, Nucleosomes, Histones, RNP/Sm, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, DFS-70 เป็นต้น หรือตรวจหาแอนติบอดีเป็นชุดที่เกี่ยวข้องกับโรค connective tissue disease (CTD) ที่สนใจได้ สามารถวัดเชิงปริมาณได้ชัดเจน

Multiplex immunoassay (MIA)

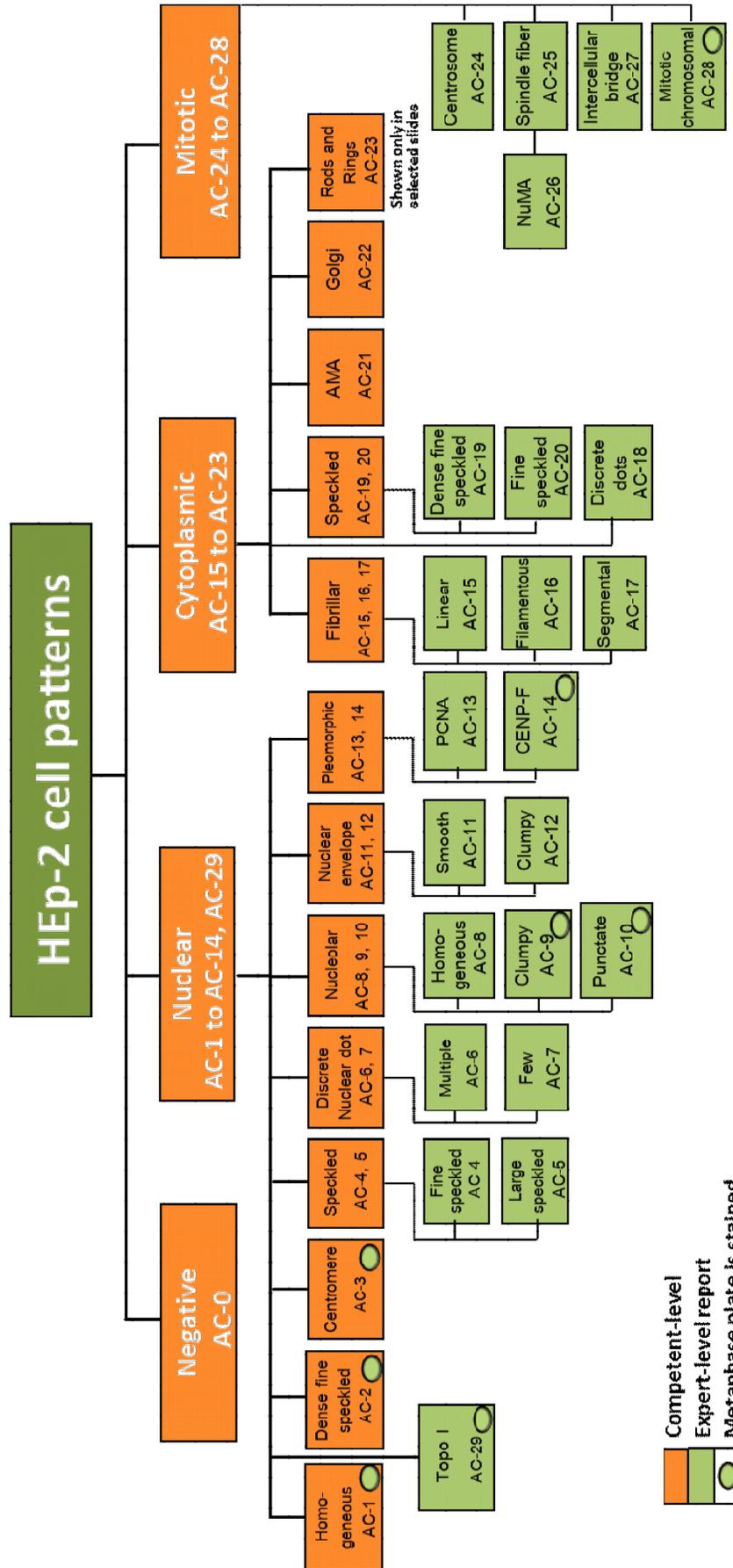
เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน ในที่นี้จะกล่าวถึงเทคนิคที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการได้แก่ เทคนิค Line immunoassay และ Multiplexed bead-based immunoassay

Line immunoassay (LIA)

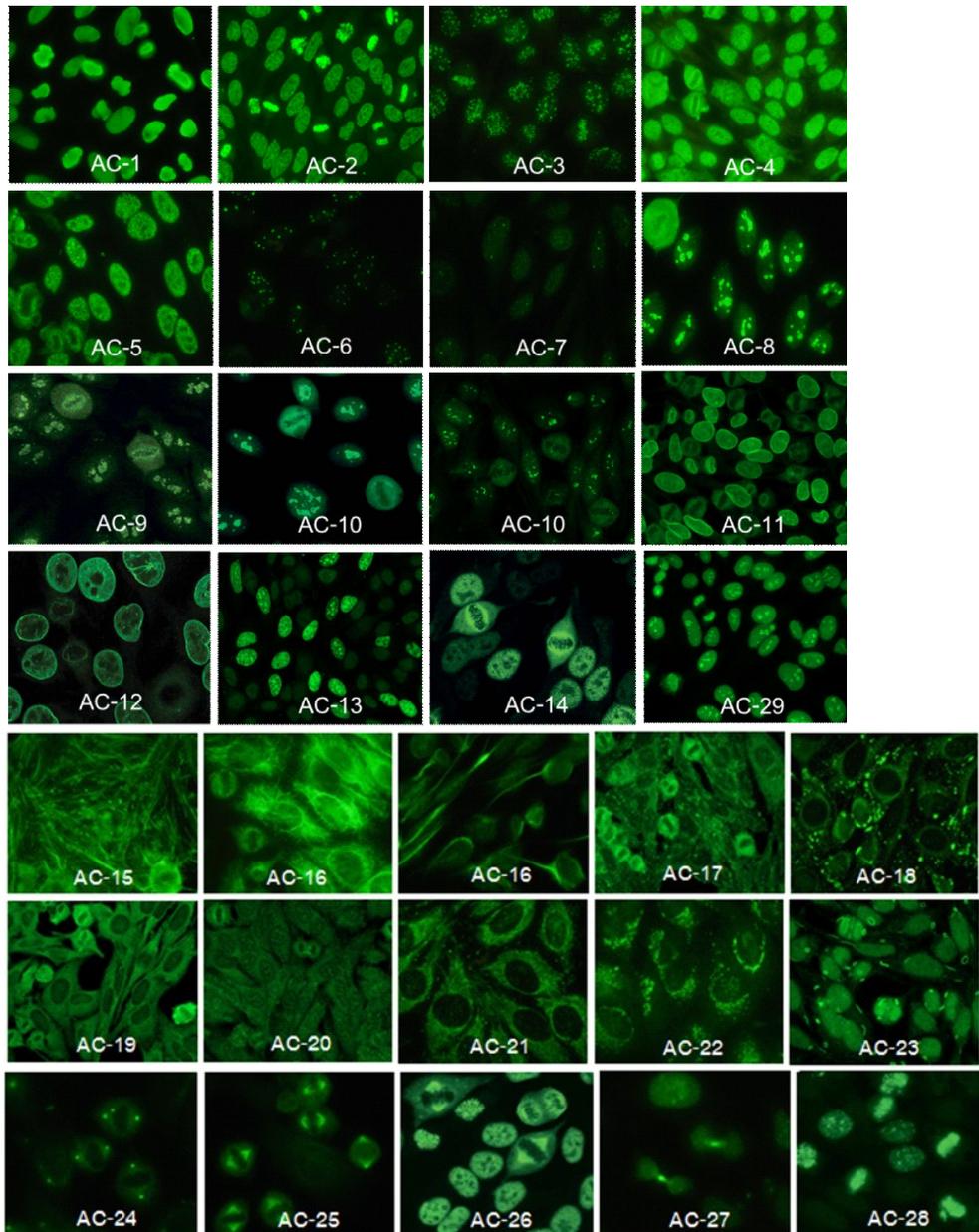
ตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยใช้ recombinant antigen ติดลงบนแผ่น nitrocellulose เป็นเส้นบาง ๆ ในตำแหน่งที่กำหนดไว้ หลังทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองแล้ว เติม anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ ดูความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นหลังจากเติมสับสเตรต แสดงผลการทดสอบเป็นเชิงคุณภาพ (qualitative) ชุดตรวจที่มีจำหน่ายส่วนใหญ่เป็นการตรวจแอนติบอดีต่อส่วนประกอบของนิวเคลียส เช่น dsDNA, Nucleosomes, Histones, Sm, RNP/Sm, SSA/Ro, SSB/La, CENP-A/B, Scl-70, PCNA, DFS70 เป็นต้น และกลุ่ม myositis autoantigens เช่น Mi-2, MDA5, NXP2, SAE1, Ku, Jo-1, PL-7, PL-12, PM/Scl และ Ro52 เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 5 วิธีนี้สามารถทำได้ง่าย อ่านผลโดยใช้โปรแกรม บางครั้งอาจพบปัญหาการแปลผล เนื่องจากแถบสีที่ไม่ชัดเจน

Multiplexed bead-based immunoassay (MBA)

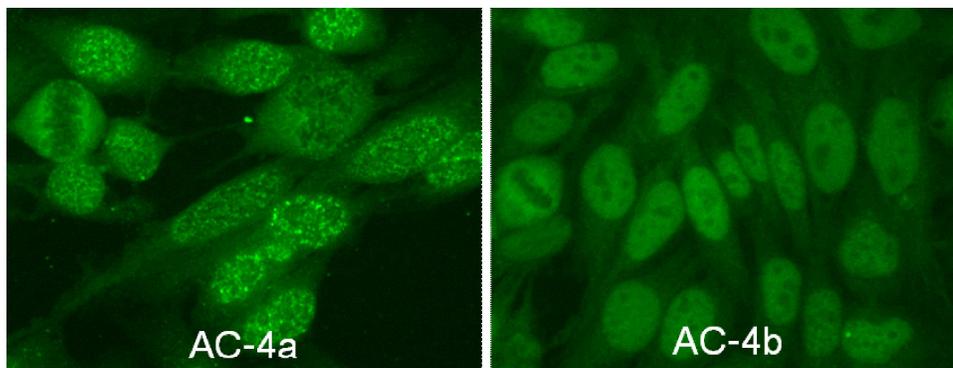
เป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยใช้ paramagnetic microspheres หรือ polystyrene beads ที่แต่ละ beads มีสีและความเข้มแสงต่าง ๆ กัน ซึ่งความเข้มแสงที่ต่างกันนี้ ใช้เป็นตัวแยก beads ให้ต่างกันอย่าง เป็น unique number หรือ beads region ที่แตกต่างกัน โดย beads เคลือบด้วยแอนติเจนที่แตกต่างกันตามชนิดของสี ดังนั้น ถ้าต้องการตรวจหาแอนติบอดีหลายชนิดพร้อมกัน ก็สามารถนำ beads มารวมในหลอดเดียวกันได้ ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ ได้แก่ addressable laser beads immunoassays (ALBIAs), multiplexed bead-based technology (Luminex/



รูปที่ 2. แผนผังแสดงรูปแบบการอ่าน HEp-2 cell ที่ระบุลำดับ Anti-cell (AC)⁽¹⁷⁾



รูปที่ 3. รูปภาพการติดสีฟลูออเรสเซนต์ใน HEp-2 cell ที่ระบุลำดับ Anti-cell (AC). AC-1 ถึง AC-14, AC-29 เป็นรูปแบบการติดสีฟลูออเรสเซนต์ในนิวเคลียส, AC15-23 เป็นรูปแบบการติดสีฟลูออเรสเซนต์ในไซโตพลาสม, AC24-28 เป็นรูปแบบการติดสีฟลูออเรสเซนต์ในเซลล์ตัวอ่อน



รูปที่ 4. รูปภาพการติดสีฟลูออเรสเซนต์ใน HEp-2 cell ของ AC-4 โดย AC-4a มีจุดวาวจำนวนมากกระจายทั่วนิวเคลียส (Myriad discrete nuclear speckled) แต่ไม่พบรูปแบบดังกล่าวใน AC-4b

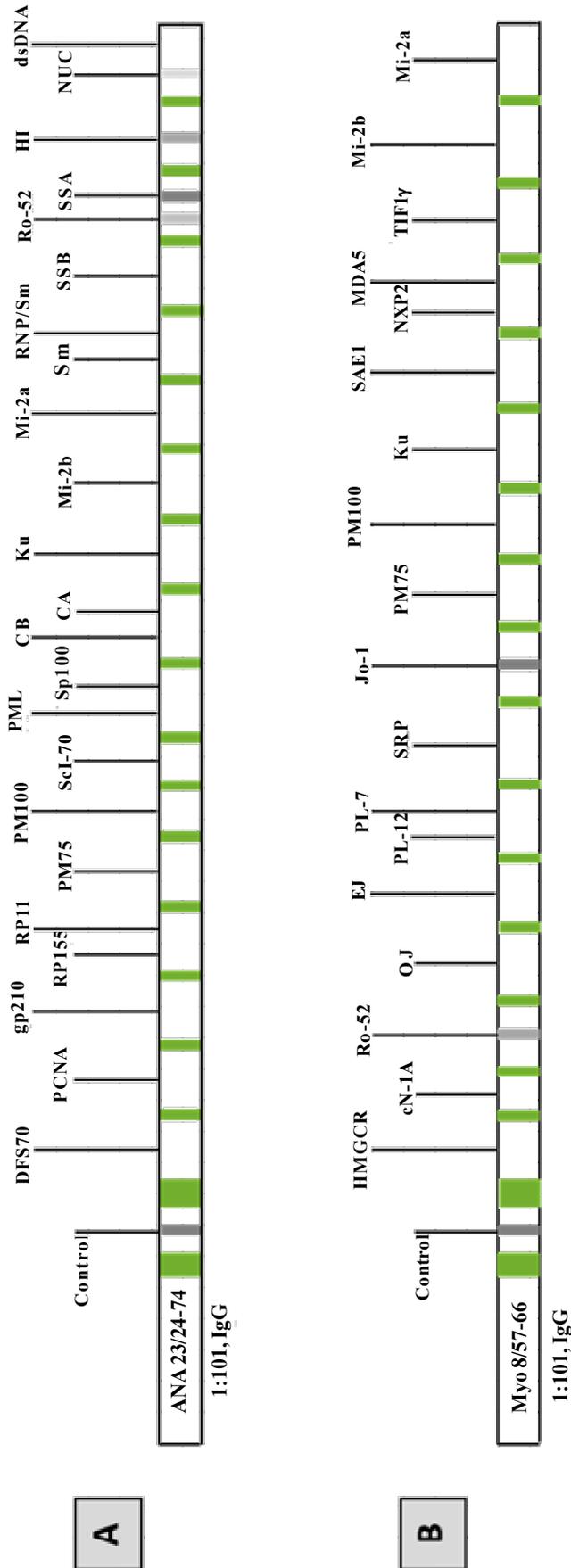
ตารางที่ 2. ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ตามหลัก International Consensus on ANA Patterns (ICAP) กับแอนติเจนและโรคที่เกี่ยวข้อง⁽¹⁵⁾

ชื่อรูปแบบ	ลักษณะการเรืองแสง	แอนติเจนที่เกี่ยวข้อง	โรคที่เกี่ยวข้อง
1. Negative (AC-0)	ไม่เรืองแสง	-	-
2. Nuclear patterns			
Homogeneous (AC-1)	ติดสีเรียบเสมอกว่านิวเคลียสและโครโมโซมใน mitotic cell	dsDNA, ssDNA, nucleosomes, histones	SLE, drug-induced lupus, JIA
Dense fine speckled (AC-2)	ติด granular ทั่วทั้งนิวเคลียสและโครโมโซม	DFS-70, LEDGF-P75	Healthy subject, other inflammatory
Centromere (AC-3)	จุดวางกระจายทั่วนิวเคลียสและโครโมโซมของ mitotic cell (เรียงตัวเป็นขั้นบันได)	CENP-A, B (C)	Limited cutaneous SSc, PBC
Fine speckled (AC-4)	จุดขนาดเล็กทั่วนิวเคลียส, ไม่ติดสีในโครโมโซม	SSA/Ro, SSB/La, Mi-2, TIF1 γ , TIF1 β ,	SjS, SLE, DM, SSc/PM overlap
Large speckled (AC-5)	จุดหายา ขนาดใหญ่ทั่วนิวเคลียส, ไม่ติดสีในโครโมโซม	hnRNP, U1RNP, U2-6snRNP(Sm), RNA polymerase III	MCTD, SLE, SSc
Multiple nuclear dots (AC-6)	มี 6 - 20 จุดต่อนิวเคลียส	Sp-100, PML, MJ/NXP-2	PBC, SARD, PM/DM
Few nuclear dots (AC-7)	มี 2 - 6 จุดต่อนิวเคลียส	p80 collin, SMN	SjS, SLE, SSc, PM, asymptomatic individuals
Nucleolar homogeneous (AC-8)	ติดสีเรียบใน nucleolus	PM/Scl, B23, Th/To, nucleolin, No55/SC65	SSc, SSc/PM overlap
Nucleolar clumpy (AC-9)	ติด fine speckled ใน nucleolus	U3-snRNP	SSc
Nucleolar punctate (AC-10)	ติด granular ใน nucleolus, มีจุด (1 - 2 จุด) ในเซลล์ตัวอ่อน	RNA polymerase I, NOR-90	SSc, SjS
Nuclear envelope : smooth (AC-11)	ติดสีเรียบที่ขอบนิวเคลียส	lamins A,B,C, or lamin-associated proteins	SLE, SjS, seronegative polyarthritis
Nuclear envelope : punctate (AC-12)	ติดสีไม่เรียบที่ขอบนิวเคลียส	nuclear pore complex proteins	PBC
PCNA-like (AC-13)	เรืองแสงในนิวเคลียสของเซลล์ระยะ S-phase เป็นจุดขนาดเล็กถึงหายา	PCNA	SLE, other conditions
CENP-F-like (AC-14)	ติด fine granular ใน G2-phase, ส่วนโครโมโซมติดเป็นจุดชิดกัน 30-50 จุด	CENP-F	Cancer, other conditions
Topo I-like (AC-29)	ติด fine granular ใน nucleoplasm และเรืองแสงในส่วน nucleolus	Topoisomerase I (Sci-70)	SSc, diffuse systemic sclerosis, polymyositis
3. Cytoplasmic patterns			
Linear (AC-15)	เส้น fiber คล้ายเกล็ดน้ำแข็ง	F-Actin	AIH, MCTD, chronic active hepatitis, liver cirrhosis, PBC, rare in SARD
Filamentous (AC-16)	เส้น fiber คล้ายร่างแห	Cytokeratin, Vimentin	Various diseases, Infectious or Inflammatory conditions

ตารางที่ 2. (ต่อ) ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ตามหลัก International Consensus on ANA Patterns (ICAP) กับแอนติเจนและโรคที่เกี่ยวข้อง⁽¹⁵⁾

ชื่อรูปแบบ	ลักษณะการเรืองแสง	แอนติเจนที่เกี่ยวข้อง	โรคที่เกี่ยวข้อง
Segmental (AC-17)	เส้น fiber ขนาดเล็ก	Alpha-actinin, vinculin	Myasthenia gravis, UC, CD
Discrete dot (AC-18)	ติด granular/drop กระจายทั่ว ไซโตพลาสซึม	GW182, Su/Ago2, Ge-1	PBC, SARD, neurological and autoimmune conditions
Dense fine speckled (AC-19)	จุดขนาดเล็กละเอียดเกือบคล้าย homogeneous	Ribosomal P-protein, PL-7, PL-12	SLE, anti-synthetase syndrome, PM, DM
Fine speckled (AC-20)	จุดขนาดเล็กทั่วไซโตพลาสซึม	Jo-1/histidyl-tRNA synthetase	anti-synthetase syndrome, PM/DM
Reticular / AMA (AC-21)	ติด granular ขนาดหยาบทั่ว ไซโตพลาสซึม	PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E1 α subunit of PDC, E3BP/protein X	PBC, SSc, rare in other SARD
Polar / Golgi-like (AC-22)	ติด granular ที่บริเวณขอบใกล้ นิวเคลียส	Giantin/macrogolgin, golgin-95/GM130, golgin- 160/97/245	Rare in SjS, SLE, RA, MCTD
Rods and Rings (AC-23)	เป็นขีดสั้น ๆ และวงกลม ที่ส่วน ไซโตพลาสซึม	IMPDH2, others	HCV patients post-IFN/ ribavirin therapy, rare in SLE, Hashimoto's and healthy controls
4. Mitotic patterns			
Centrosome (AC-24)	ติดส่วน Centriole	Pericentrin, Enolase, ninein, Cep250, Cep110	Rare in SSc, Raynaud, Infection
Spindle fibers (AC-25)	ติดส่วน spindle apparatus	HsEg5	Rare in SjS, SLE, other SARD
NuMA-like (AC-26)	ติด spindle apparatus, granular ในระยะ interphase	Centrophilin	SjS, SLE, other
Intercellular bridge (AC-27)	ติดส่วน midbody	Aurora kinase B, CENP-E, MSA-2, KIF-14, MKLP-1	Rare in SSc, Raynaud, malignancy
Mitotic chromosomal (AC-28)	ใน Chromosome ของระยะ pro และ metaphase ติดลักษณะ เป็น dot	Modified histone H3, MCA1	Rare in discoid lupus erythematosus, chronic lymphocytic leukemia, SjS and polymyalgia rheumatica

dsDNA: double stranded DNA, ssDNA: single stranded DNA, SLE: Systemic lupus erythematosus, JIA: Juvenile idiopathic arthritis, DFS: dense fine speckled, LEDGF-P75: lens epithelium-derived growth factor p75, CENP-A: centromere protein A, CENP-B – centromere protein B, CENP-F: centromere protein-F, SSc : Systemic sclerosis, PBC: Primary biliary cholangitis, SS-A (Ro): antigen A associated with Sjögren syndrome, SS-B (La): antigen B associated with Sjögren syndrome, Sm: Smith, SjS: Sjögren syndrome, DM: dermatomyositis, PM: polymyositis, MCTD: Mixed connective tissue disease, PML: promyelocytic leukemia, SARD: systemic autoimmune rheumatic diseases, SMN: survival of motor neuron, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, AIH: Autoimmune hepatitis, UC: ulcerative colitis, CD: Crohn's disease, RA: rheumatoid arthritis, IMPDH2: inosine monophosphate dehydrogenase II, HCV: Hepatitis C virus.

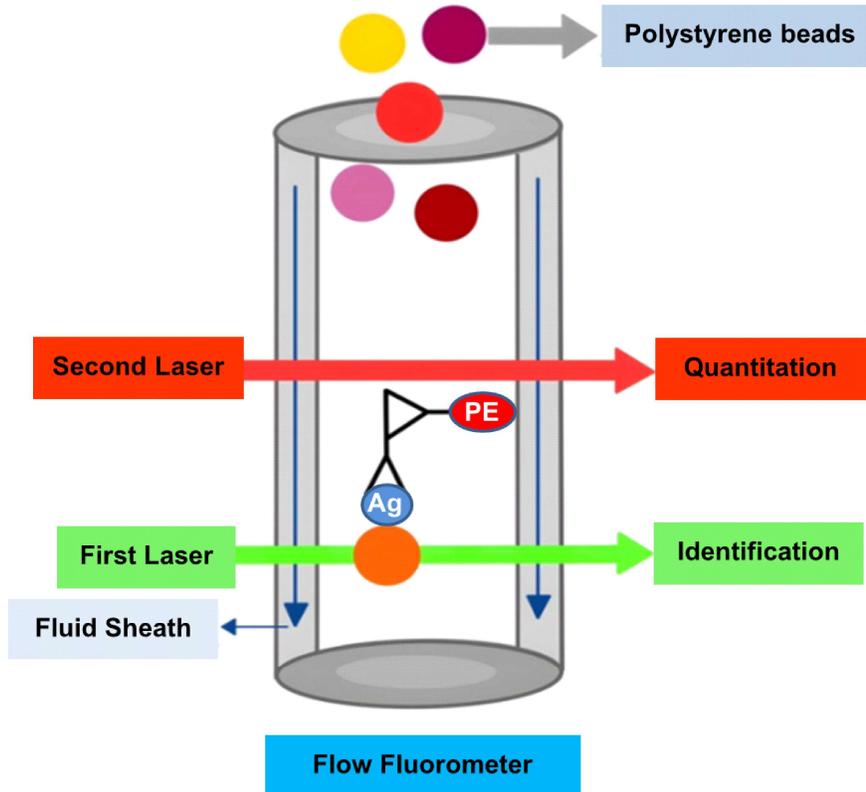


รูปที่ 5. แสดง Line immunoblot ของการทดสอบหาแอนติบอดีต่อส่วนของประกอบของนิวเคลียส ได้แก่ DFS70, PCNA, gp210, RP155, RP11, PM75, PM100, ScI-70, PML, Sp100, Centromere A/B, Ku, Mi-2a/b, Sm, RNP/Sm, SS-B, Ro-52, SS-A, Histones, Nucleosome และ dsDNA (EUROLINE ANA Profile 23 IgG : EUROIMMUN, Germany) (A), กล้ามเนื้อ Myositis มีแอนติบอดีต่อHMGCR, cN-1A, Ro-52, OJ, EJ, PL7, PL12, SRP, Jo-1, PM75, PM100, Ku, SAE1, NXP2, MDA5, TIF1γ, Mi-2ab (EUROLINE Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag et cN-1A et HMGCR IgG : EUROIMMUN, Germany) (B).

chemiluminescence immunoassay) และ BioPlex2200 เป็นต้น หลังจากเติมสิ่งส่งตรวจลงในหลอดปฏิกิริยา หากมีแอนติบอดีที่จำเพาะ จะเกิดปฏิกิริยาจับกันเป็น antibody-antigen-bead complex จากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ได้แก่ phycoerythrin (PE) แล้วนำไปตรวจวัดผลด้วยเครื่อง analyzer โดยเลเซอร์ตัวแรกตรวจจับสีของ beads ทำให้ทราบชนิดแอนติเจน ส่วนเลเซอร์ตัวที่สองตรวจจับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ทำให้ทราบปริมาณของอโตแอนติบอดีที่จำเพาะ⁽²²⁾ ดังแสดงในรูปที่ 6

เทคนิค MBA มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ต้อง

อาศัยเครื่องมือที่จำเพาะ มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งชนิดของแอนติเจนที่นำมาเคลือบมีจำนวนจำกัดเช่นเดียวกับเทคนิค LIA ในขณะที่เทคนิค IIF สามารถตรวจแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบของนิวเคลียสได้มากกว่า 100 ชนิด⁽⁵⁾ เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 วิธีจึงมีบางรายงานพบว่า เทคนิค IIF มีความไวมากกว่าเทคนิค EIA และ MIA (ร้อยละ 96.8, ร้อยละ 79.8 และ ร้อยละ 82.9 ตามลำดับ) แต่ความจำเพาะของเทคนิค IIF ต่ำกว่าทั้ง 2 เทคนิค (ร้อยละ 40.0, ร้อยละ 70.0 และร้อยละ 57.0 ตามลำดับ)⁽²⁰⁾ ในขณะที่เทคนิค MBA มีความไวและความจำเพาะ (ร้อยละ 79.0 และร้อยละ 83.8) สูงกว่าเทคนิค LIA (ร้อยละ 75.3 และร้อยละ 77.0)⁽²³⁾



รูปที่ 6. การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะโดยหลักการ Multiplexed bead-based Immunoassay (MBA)

สรุป

ANA เป็นกลุ่มออกโตแอนติบอดีต่อส่วนประกอบของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ที่มีความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยและตรวจติดตามรักษากลุ่มโรค systemic autoimmune diseases ซึ่งการตรวจหา ANA ด้วยหลักการ IIF เป็น “Gold standard” เนื่องจากเซลล์ตั้งต้นที่ใช้ คือ เซลล์ HEp-2 มีโครงสร้างส่วนประกอบทั้งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม จึงมีความหลากหลายของแอนติเจนมากกว่า 100 ชนิด ซึ่งทาง ICAP กำหนดรูปแบบการอ่านผลการทดสอบ โดยให้ระบุรูปแบบการเรืองแสง ลำดับ AC และระดับไตเตอร์ เช่น fine speckled (AC-4) 1:160 และ cytoplasmic linear (AC-15) 1:80 เป็นต้น ได้มีการพัฒนาหลักการ IIF โดยนำระบบปฏิบัติการอัตโนมัติที่ประกอบด้วย เครื่องอัตโนมัติสำหรับทำการทดสอบ กล้องฟลูออเรสเซนซ์อัตโนมัติและโปรแกรมวิเคราะห์ผลการทดสอบมาช่วยทดแทนบุคลากรพบว่าเครื่องอัตโนมัติมีประสิทธิภาพดี แต่มีข้อจำกัดในการ

อ่านรูปแบบการเรืองแสงที่ยังคงต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญมายืนยันผลการทดสอบอีกครั้ง ปัจจุบันปริมาณตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น ทำให้บางห้องปฏิบัติการเปลี่ยนมาใช้วิธี EIA หรือ MIA เนื่องจากใช้เครื่องอัตโนมัติในการตรวจวิเคราะห์ มีข้อดี คือ สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยบุคลากรที่ชำนาญในการอ่านผลแม้ว่าจะเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่พบผลบวกเทียมค่อนข้างสูงด้วย เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 หลักการ พบว่าหลักการ IIF มีความไวมากกว่าหลักการ EIA และ MIA แต่หลักการ IIF มีความจำเพาะต่ำกว่าทั้ง 2 หลักการ และพบว่าเทคนิค MBA มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าเทคนิค LIA จึงเห็นได้ว่าแต่ละหลักการมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 3 ฉะนั้นการเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจหา ANA จึงมีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย และติดตามการรักษาได้อย่างถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น

ตารางที่ 3. แสดงการเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของแต่ละหลักการในการตรวจหา ANA

หลักการ	ข้อดี	ข้อเสีย
IIF	ราคาต่ำ ความไวสูง	ใช้เวลานาน อาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญ
EIA	ใช้เครื่องอัตโนมัติ ความไวและความจำเพาะสูง ตรวจแอนติบอดี IgG, IgM และ IgA ได้ แสดงผลเชิงคุณภาพ / เชิงปริมาณ	ผลบวกปลอมสูง ราคาแพง
LIA	ทำได้ง่าย, รวดเร็ว ใช้เครื่องอัตโนมัติได้ ตรวจหาแอนติบอดีหลายชนิดพร้อมกัน	ผลเชิงคุณภาพ อาจพบปัญหาจากแถบสีที่ไม่ชัดเจน ราคาแพง
MBA	ความไวและความจำเพาะสูง ใช้เครื่องอัตโนมัติ ตรวจหาแอนติบอดีหลายชนิดพร้อมกัน ความไวและความจำเพาะสูง แสดงผลเชิงปริมาณ	ราคาแพง เครื่องมือต้องมีความจำเพาะ

เอกสารอ้างอิง

1. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res* 2014;2014: 315179.
2. Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, Fritzler MJ, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Ann Rheum Dis* 2019;78:879-89.
3. Kang EH, Ha YJ, Lee YJ. Autoantibody biomarkers in rheumatic diseases. *Int J Mol Sci* 2020;21:1382.
4. Wongpratoom W. Up-to-date in Anti-Nuclear Abs for clinical use. *J Med Tech Phy Ther* 2018;30:1-17.
5. Ricchiuti V, Adams J, Hardy DJ, Katayev A, Fleming JK. Automated processing and evaluation of anti-nuclear antibody indirect immunofluorescence testing. *Front Immunol* 2018;9:927.
6. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73: 17-23.
7. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American college of pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124: 71-81.
8. Tešija Kuna A, Derek L, Drvar V, Kozmar A, Gugo K. Assessment of antinuclear antibodies (ANA): National recommendations on behalf of the croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine. *Biochem med (Zagreb)* 2021;31: 020502.
9. Olsen NJ, Choi MY, Fritzler MJ. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2017;19:172.
10. Yang Z, Liang Y, Zhong R. Is identification of Anti-SSA and/or -SSB antibodies necessary in serum sample referred for antinuclear antibodies testing? *Clin Lab Anal* 2012;26:447-51.
11. Yoo IY, Oh JW, Cha HS, Koh EM, Kang ES. Performance of an automated fluorescence antinuclear antibody image analyzer. *Ann Lab Med* 2017;37:240-7.
12. van Beers J, Hahn M, Fraune J, Mallet K, Krause C, Hormann W, et al. Performance analysis of automated evaluation of antinuclear antibody indirect immunofluorescent tests in a routine setting. *Auto Immun Highlights* 2018;9:8.
13. Choi HW, Kwon YJ, Park JH, Lee SY, Chun S, Won EJ, et al. Evaluation of a fully automated antinuclear antibody indirect immunofluorescence assay in routine use. *Front Immunol* 2020;11:607541.
14. Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. *BMC Med* 2014;12:38.
15. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015. *Front Immunol* 2015;6:412.
16. Chan EK, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PL, et al. Report on the second international consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus* 2016;25:797-804.
17. Chan EK, von Mühlen CA, Fritzler MJ, Damoiseaux J, Infantino M, Klotz W, et al. The international consensus on ANA Patterns (ICAP) in 2021 - The 6th Workshop and current perspectives. *J Appl Laboratory Med* 2022;7:322-30.
18. von Mühlen CA, Garcia De La Torre I, Infantino M, Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, et al.

- How to report the antinuclear antibodies (anti-cell antibodies) test on HEP-2 cell: guidelines from the ICAP initiative. *Immunol Res* 2021;69:594-608.
19. 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.
 20. Verizhnikova ZG, Aleksandrova EN, Novikov AA, Panafidina TA, Seredavkina NV, Popkova TV, et al. The clinical informativeness of automated methods of screening detection of anti-nuclear antibodies using indirect reaction of immune fluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay and multiplex xmap technology under systemic lupus erythematosus. *Klin Lab Diagn* 2017;62:173-7.
 21. Tayde A, Agrawal C, Deshmukh AT. Comparison of immunofluorescence assay (IF) with ELISA in detection of antinuclear antibodies. *Indian J Pathol Oncol* 2018;5:418-20.
 22. Binder SR. Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus* 2006;15:412-21.
 23. Yuan W, Cao H, Li W, Wu X, Zheng J. Comparison study of bead-based and line-blot multiplex ANA immunoassays in the diagnosis of systemic autoimmune rheumatic diseases. *Clin Rheumatol* 2022;41:899-909.