

Review article

Serological biomarker of autoimmune liver diseases

Niramol Thammacharoenrach^{1,*}, Yadah Kaewopas², Kanthaporn Dityen²

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

Autoimmune liver diseases (ALD) are the group of liver diseases caused by the immune system that damage cells and tissues of the liver. The patients with this disease have chronic hepatitis or severe hepatitis and up to liver failure. The detection of liver-related autoantibodies is very important for serological diagnosis, monitoring and classification of ALD, such as autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis (PBC), and primary sclerosing cholangitis (PSC), etc. Serological markers of ALD include anti-nuclear antibodies (ANA) and anti-smooth muscle antibodies (ASMA) are found in AIH type 1, while anti-liver kidney microsome antibodies type-1 (anti-LKM1) and/or anti-liver cytosol type-1 (anti-LC1) are found in AIH type 2. Anti-mitochondria antibodies (AMA) are specific to PBC. On the other hand, atypical perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) are highly detectable in PSC. Most of the autoantibody tests used indirect immunofluorescence (IIF) on different substrate in each type. In addition, there are many other specific autoantibodies that are detected using enzyme immunoassay (EIA) and line immunoassay (LIA). In conclusion, this review focuses on the serological marker of autoantibodies in each ALD group used in the laboratory for the benefit of medical personnel.

Keywords: Autoimmune hepatitis, autoimmune liver disease, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, indirect immunofluorescence.

***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: September 15, 2024

Revised: November 30, 2024

Accepted: January 10, 2025

บทฟื้นฟูวิชาการ

ตัวชี้วัดชีวภาพทางน้ำเหลืองของโรคตับจากภูมิคุ้มกันต้านทานตนเอง

นิรมล ธรรมาเจริญราช^{1*}, ญาดา แก้วโอภาส², กัณฐาภรณ์ ดิษเย็น²

¹ฝ่ายจุลชีววิทยา, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย

บทคัดย่อ

Autoimmune liver diseases (ALD) เป็นกลุ่มโรคตับที่เกิดจากภูมิคุ้มกันต้านทานตนเองเข้าไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของตับ ผู้ป่วยโรคนี้มีอาการตับอักเสบเรื้อรัง หรือ อาการตับอักเสบรุนแรง จนถึง ภาวะตับวายได้ การตรวจหาอโตแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องกับตับจึงมีความสำคัญมากต่อการตรวจวินิจฉัย ติดตามการรักษาและจำแนกกลุ่มโรค ALD เช่น autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis (PBC) และ primary sclerosing cholangitis (PSC) เป็นต้น ตัวชี้วัดทางน้ำเหลืองที่สำคัญ ได้แก่ anti-nuclear antibodies (ANA) และ anti-smooth muscle antibodies (ASMA) พบได้ในกลุ่มโรค AIH type 1 ส่วน anti-liver kidney microsome antibodies type-1 (anti-LKM1) และ/หรือ anti-liver cytosol type-1 (anti-LC1) พบได้ใน AIH type 2 สำหรับ anti-mitochondria antibodies (AMA) มีความจำเพาะต่อโรค PBC และ atypical perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) ตรวจพบได้สูงในโรค PSC การตรวจหาอโตแอนติบอดีดังกล่าวส่วนใหญ่ใช้หลักการ indirect immunofluorescence (IIF) โดยใช้เซลล์ตั้งต้นแตกต่างกันในแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาอโตแอนติบอดีที่จำเพาะอื่น ๆ อีกหลายชนิด โดยใช้หลักการ enzyme immunoassay (EIA) และ line immunoassay (LIA) โดยสรุปบทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทบทวนความสำคัญของอโตแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องในแต่ละกลุ่มโรค ALD ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับบุคลากรทางการแพทย์

คำสำคัญ: โรคตับจากภูมิคุ้มกันต้านทานตนเอง, โรคตับแข็งจากท่อน้ำดีปฐมภูมิ, โรคตับแข็งจากการอักเสบที่ท่อน้ำดี, Indirect immunofluorescence.

โรคตับที่เกิดจากภูมิคุ้มกันต้านทานร่างกายของตนเอง เข้าไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของตับ (autoimmune liver disease; ALD) สาเหตุการเกิดโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีข้อสันนิษฐานว่าอาจจะเกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม พันธุกรรม เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพของโรคนี้ รวมทั้งการติดเชื้อไวรัส ซึ่งไวรัสนั้นๆ อาจมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับเซลล์ตับ จึงสันนิษฐานว่าเป็นเหตุเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของตับ เช่น measles virus, hepatitis viruses, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus และ herpes simplex virus เป็นต้น และปัจจัยจากการได้รับยาสมุนไพร หรือยาบางชนิด ก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคนี้ อาทิ เช่น nitrofurantoin, minocycline รวมถึงยากลุ่ม statins และ tumor necrosis factor inhibitor เป็นต้น^(1, 2)

กลุ่มโรค ALD ที่สำคัญได้แก่ autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis (PBC) และ primary sclerosing cholangitis (PSC) เป็นต้น สามารถตรวจวินิจฉัยได้จากอาการทางคลินิก ความผิดปกติของชิ้นเนื้อตับ ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในเลือดผิดปกติ และการตรวจหาแอนติบอดีที่เกี่ยวข้อง (ตารางที่ 1) ในผู้ป่วยบางราย อาจเกิดโรคร่วมกันได้มากกว่า 1 กลุ่มโรค เรียกภาวะนี้ว่า overlap syndromes หรือผู้ป่วยบางรายตรวจพบว่ามีอาการ

ทางคลินิกและผลความผิดปกติของชิ้นเนื้อตับ เข้าได้กับกลุ่ม PBC แต่ตรวจไม่พบ anti-mitochondrial antibodies (AMA) ซึ่งโดยปกติ AMA มีความจำเพาะต่อโรค PBC สูง จึงเรียกกลุ่มนี้ว่า outlier syndrome (autoimmune cholangitis (AIC) หรือ AMA-negative PBC)⁽³⁾

Autoimmune hepatitis (AIH)

โรค AIH มีลักษณะอาการของตับอักเสบเรื้อรังที่ไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด ส่วนมากพบในกลุ่มคนยุโรปและคนผิวขาว เพศหญิงมากกว่าเพศชายในอัตราส่วน 4 : 1⁽³⁾ การตรวจวินิจฉัยโรคส่วนใหญ่จากอาการทางคลินิกและผลการทดสอบน้ำเหลืองทางห้องปฏิบัติการ ทำให้สามารถแยกโรคอื่นที่มีอาการคล้ายคลึงกันออกได้ เช่น viral hepatitis, Wilson's disease, PBC, PSC, alcoholic liver disease หรือ drug reaction สามารถแบ่งโรค AIH ได้เป็น 2 ชนิด คือ AIH-type 1 พบได้ในทุกช่วงอายุ แต่ส่วนใหญ่มักพบในวัยรุ่นหรือคนหนุ่มสาว และ AIH-type 2 พบได้ในช่วงอายุระหว่าง 2 - 14 ปี หรือผู้ป่วยเด็กเพศหญิง เมื่อเทียบระดับความรุนแรงพบว่า AIH-type 2 มีความรุนแรง และโอกาสการเกิดตับแข็งได้มากกว่า AIH-type 1^(1, 2, 4 - 10)

Table 1. ลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกในโรค autoimmune liver disease.⁽³⁾

	AIH	PBC	PSC	AIC
เพศหญิง : เพศชาย	4 : 1	9 : 1	1 : 2	9 : 1
เอนไซม์ตับที่พบสูง	AST, ALT	ALP, γ -GT	ALP, γ -GT	ALP, γ -GT
อิมมูโนโกลบูลินที่พบสูง	IgG	IgM	IgG, IgM	IgM
แอนติบอดีที่เกี่ยวข้อง	ANA, ASMA, LKM1, SLA/LP, p-ANCA	AMA, AMA-M2, gp210	p-ANCA	ANA, ASMA
HLA ที่เกี่ยวข้อง	A3, B8, DR3, DR4	DR8 (เกี่ยวข้องน้อย)	DR52	B8, DR3, DR4
ความผิดปกติของชิ้นเนื้อตับ	Interface และ lobular hepatitis; พบ plasma cells ปริมาณมาก	ภาวะท่อน้ำดีขยายตัว	ภาวะพังผืดและการตีตันของท่อน้ำดีขนาดใหญ่	ภาวะท่อน้ำดีขยายตัว

ANA, Anti-nuclear antibodies; ASMA, Anti-smooth muscle antibodies; Anti-LKM1, Anti-liver kidney microsomal antibody type 1; Anti SLA/LP, Anti-soluble liver antigen/liver pancreas ; p-ANCA, perinuclear anti-neutrophilic cytoplasmic antibodies; AMA, Anti mitochondria antibodies; AMA-M2, Anti mitochondria antibodies-M2; gp210, glycoprotein-210

Primary biliary cirrhosis (PBC)

โรคตับแข็งจากท่อน้ำดีปฐมภูมิ คือ โรคตับเรื้อรังชนิดหนึ่งที่มีการอักเสบทั้งในส่วนท่อน้ำดีขนาดเล็ก interlobular bile ducts และแขนงของท่อน้ำดี การอักเสบเป็นเวลานานทำให้เกิดแผลเป็น (scar) ซึ่งเป็นสาเหตุของตับแข็ง โรคนี้พบได้ในกลุ่มคนทุกเพศทุกวัย ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุระหว่าง 40 - 60 ปี พบเพศหญิงถึงร้อยละ 90 ตรวจวินิจฉัยจากอาการทางคลินิก ภาวะการทำงานของตับ ภาพถ่ายคลื่นความถี่สูง ความผิดปกติของชิ้นเนื้อตับ และการตรวจวิเคราะห์ทางน้ำเหลือง (3, 11, 12)

Primary sclerosing cholangitis (PSC)

โรคตับแข็งที่เกิดจากการอักเสบที่ท่อน้ำดี (sclerosing cholangitis) โดยไม่ทราบสาเหตุ โรคตับเรื้อรังชนิดนี้มีการอักเสบของท่อน้ำดี intrahepatic bile ducts และ/หรือ ส่วนของ extrahepatic bile ducts มากขึ้นเรื่อยๆ จนเกิดแผล และทำให้เกิดพังผืด (fibrosis) ตีบตันการไหลของน้ำดีที่จะไหลสู่ทางเดินอาหาร ซึ่งทำให้เกิดการสะสมของน้ำดีภายในตับ และนำไปสู่การเกิดภาวะตับแข็ง ตับวายและมะเร็งตับ โรคนี้พบน้อยกว่า PBC พบเพศชายมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วน 2 : 1 สามารถตรวจวินิจฉัยได้จากอาการทางคลินิก การตรวจชิ้นเนื้อตับ และการตรวจวิเคราะห์ทางน้ำเหลือง (3, 9, 12)

การตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินที่เกี่ยวกับตับมีความสำคัญมากต่อการตรวจวินิจฉัย ติดตามการรักษา และจำแนกกลุ่มโรค ALD ออกจากโรคอื่นที่มีอาการคล้ายคลึงกันได้อย่างถูกต้อง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการรักษาของแพทย์ บทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทบทวนความสำคัญของอิมมูโนโกลบูลินที่เกี่ยวกับในแต่ละกลุ่มโรค ALD ที่ใช้ทางห้องปฏิบัติการให้เป็นปัจจุบัน

การตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินในโรคตับ

สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการตรวจอิมมูโนโกลบูลินต่อกลุ่มโรค ALD ทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ซีรัม หรือ พลาสมา การตรวจวิเคราะห์ทางน้ำเหลืองส่วนใหญ่ใช้เทคนิค indirect immunofluorescence (IIF) โดยใช้ชิ้นเนื้อประเภท multi-organ จากสัตว์จำพวก rodent (ส่วนมากเป็นหนู) ได้แก่ liver, kidney และ stomach รวมถึงเซลล์ HEp-2 (human epithelial cell จาก laryngeal carcinoma) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะอื่นๆ โดยใช้เทคนิค enzyme immunoassay (EIA) และ line immunoassay (LIA)

ตัวชี้วัดทางน้ำเหลืองที่สำคัญต่อการตรวจวินิจฉัย

โรคตับ ได้แก่ anti-nuclear antibodies (ANA), smooth muscle antibodies (ASMA), anti-liver kidney microsome antibodies type-1 (anti-LKM1), anti-liver cytosol type-1 (anti-LC1), anti-soluble liver antigen/liver pancreas (Anti-SLA/LP), atypical perinuclear anti-neutrophilic cytoplasmic antibodies (P-ANCA) และ anti-mitochondria antibodies (AMA) (1, 2, 4 - 10, 13 - 16) (ตารางที่ 2) ซึ่งอิมมูโนโกลบูลินบางชนิดมีความจำเพาะสูง สามารถช่วยในการวินิจฉัยโรค บางชนิดมีความจำเพาะต่ำ แต่สามารถช่วยทำนายหรือติดตามโรคได้ ดังนั้นการเลือกตรวจด้วยการทดสอบใด อยู่ที่เหมาะสมและประโยชน์ที่ได้จากการทดสอบนั้น ๆ

Anti-nuclear antibodies (ANA)

การตรวจวิเคราะห์หา ANA นิยมส่งตรวจในกลุ่มโรค autoimmune รวมทั้งในกลุ่มโรคตับ ใช้หลักการ IIF เป็นการตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening test) สำหรับตรวจหาอิมมูโนโกลบูลินต่อส่วนประกอบของนิวเคลียสหลายชนิด ได้แก่ กรดนิวคลีอิก ส่วนประกอบของโปรตีนในนิวเคลียสและส่วนประกอบในไซโทพลาซึม เซลล์ตั้งต้นที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่เซลล์ HEp-2 การตรวจหา ANA ถือเป็นอิมมูโนโกลบูลินตัวแรกที่เกี่ยวข้องกับ AIH ตรวจพบได้ที่ระดับไตเตอร์มากกว่า 1 : 40 ในผู้ใหญ่ และมากกว่า 1 : 20 ในเด็ก สามารถตรวจพบ ANA ในโรค AIH-type 1 ได้ร้อยละ 60 - 70 รวมทั้งพบผลบวกร่วมกันของ ANA และ ASMA ถึงร้อยละ 60 ในผู้ป่วยที่มี ANA เป็นผลบวก ส่วนใหญ่พบรูปแบบการเรืองแสง homogeneous ขณะที่รูปแบบการเรืองแสง coarse speckled หรือ fine speckled พบได้น้อย แอนติเจนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับ AIH ที่ตรวจพบใน ANA คือ single- และ double-stranded deoxyribonucleic acid (DNA), small nuclear ribonucleoproteins (sn-RNPs), centromeres, histones, chromatin และ cyclin (3) นอกจากนั้น ANA ยังสามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วย PBC ซึ่งมีรูปแบบการเรืองแสงเป็น multiple nuclear dot, nuclear membrane และ centromere รวมทั้งกลุ่มโรค systemic autoimmune diseases เช่น systemic lupus erythematosus (SLE), sjögren's syndrome และ systemic sclerosis (SSC) เป็นต้น แม้ว่า ANA จะมีความสำคัญ แต่มีความจำเพาะต่ำต่อการวินิจฉัยโรค AIH นอกเหนือจากหลักการ IIF แล้ว ยังสามารถตรวจหา ANA

Table 2. ความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่เกี่ยวข้องในการวินิจฉัย autoimmune liver diseaseS.^(4, 7)

ชนิดแอนติบอดี	แอนติเจนที่เกี่ยวข้อง	ชนิดของโรคตับ	ความสำคัญทางคลินิก	การตรวจพบ AIH (%)	หลักการตรวจวิเคราะห์	วิเคราะห์เชิงโมเลกุล
ANA	Chromatin	AIH	Diagnostic of	60.0-70.0	IIF	ELISA, IB, LIA
	Histones	PBC	AIH-1			
	Centromeres	PSC				
	Cyclin A	Drug-induced				
	Ribonucleoproteins	Chronic hepatitis C				
	Double stranded DNA	Chronic hepatitis B				
	DNA	Nonalcoholic fatty liver disease				
	Single stranded DNA					
SMA	Microfilaments (Filamentous actin)	Same as ANA	Diagnostic of AIH-1	Up to 85.0	IIF	ELISA
	Intermediate filaments (vimentin, desmin)					
Anti-LKM1	Cytochrome P4502D6	AIH-2	Diagnostic of AIH-2	At least 70.0 in AIH-2	IIF	ELISA, IB, LIA, RIA
		Chronic hepatitis C				
Anti-LC1	Formimino-transferase	AIH-2	Diagnostic of AIH-2 (Prognosis of severe disease)	30.0 in AIH-2	IIF	ELISA, LIA, RIA
	cyclodeaminase	Chronic hepatitis C				
Anti-SLA/LP	tRNP ^{(ser)sec}	AIH	Diagnostic of AIH (Prognosis of severe disease, relapse and treatment)	Up to 20.0 – 30.0 in AIH	Inhibition ELISA	ELISA, IB, RIA
		Chronic hepatitis C				
p-ANCA	Nuclear lamina proteins	AIH	Diagnostic of AIH-1	20.0 – 96.0 in AIH-1	IIF	N / A
		PSC / ASC	(Re-classification of cryptogenic chronic hepatitis as AIH 1)			
AMA	E2 subunits of 2-oxoacid dehydrogenase complexes, particularly PDC-E2	PBC	Against diagnosis of AIH	-	IIF	ELISA, IB, RIA

AIH, Autoimmune hepatitis; PBC, Primary biliary cirrhosis; PSC, Primary sclerosing cholangitis; ASC, autoimmune sclerosing cholangitis; ANA, Anti-nuclear antibodies; SMA, Anti-smooth muscle antibodies; Anti-LKM1, Anti-liver kidney microsomal antibody type 1; Anti-LC1, Anti-liver cytosol antibody type 1; Anti-SLP/LP, Anti-soluble liver antigen/liver pancreas; p-ANCA, perinuclear anti-neutrophilic cytoplasmic antibodies; AMA, Anti-mitochondria antibodies; IIF, indirect immunofluorescence; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IB, immunoblot; LIA: line-immuno-assay; RIA, radioimmunoassay; N / A, not applicable.

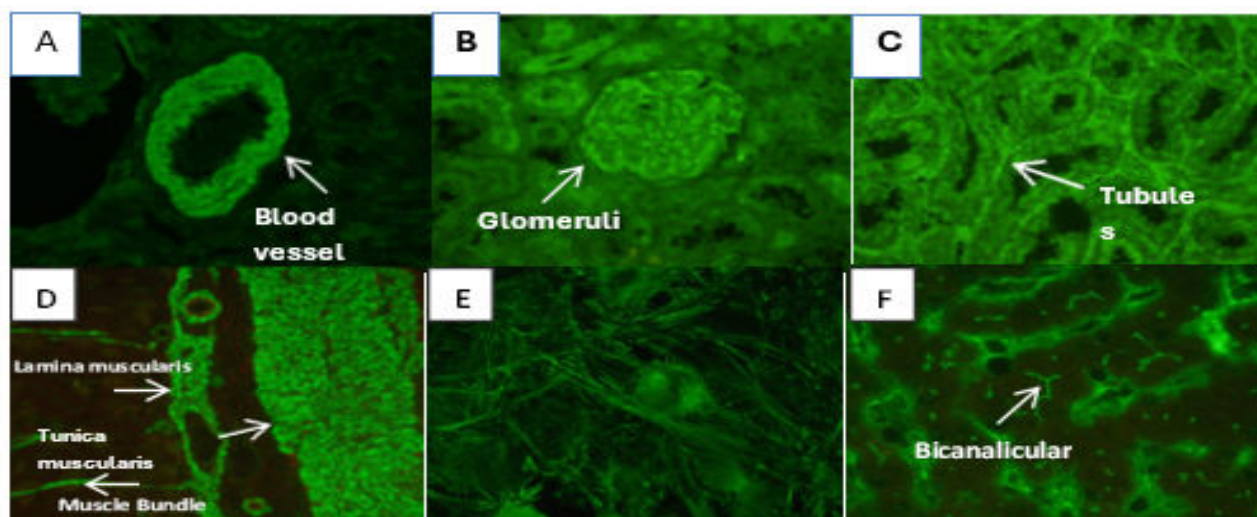


Figure 1. รูปภาพการติดสีวแสงในการตรวจหา anti-smooth muscle antibodies (ASMA) ใช้หลักการ IIF ใน rat kidney, stomach, primate liver และ anti-nuclear antibodies. (A) blood vessel ใน rat kidney; (B) glomeruli ใน rat kidney; (C) tubules ใน rat kidney; (D) lamina muscularis, blood vessel, muscle bundle และ tunica muscularis ใน rat stomach; (E) anti-actin ใน HEp-2 cells; and (F) bicanalicular ใน primate liver.

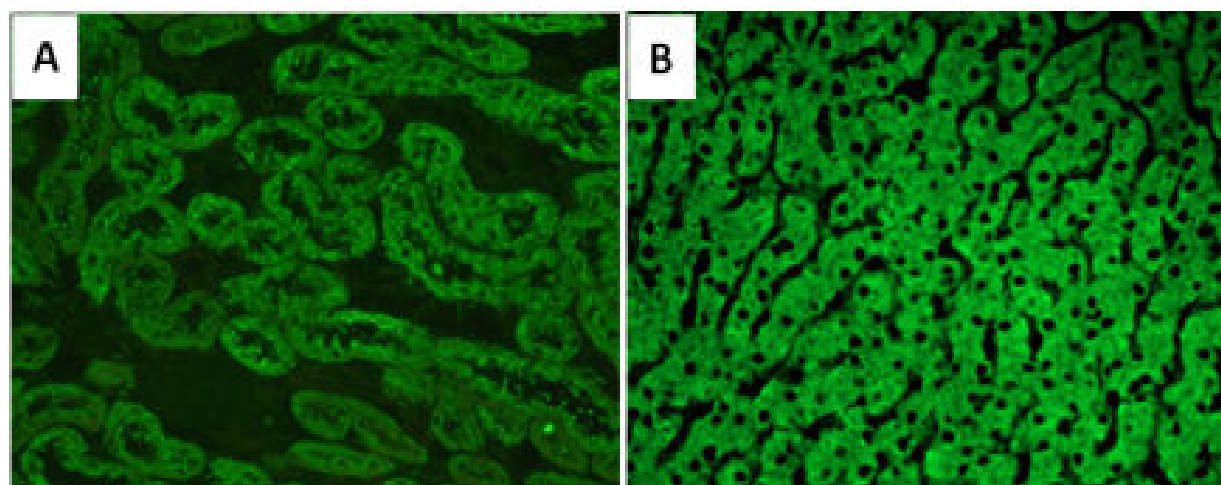


Figure 2. รูปภาพการติดสีวแสงในการตรวจหา anti-LKM1 ด้วยหลักการ IIF; (A) anti-LKM1 ใน rat kidney; (B) anti-LKM1 ใน primate liver.

ด้วยหลักการอื่น ได้แก่ Enzyme immunoassay (EIA) เป็นวิธีการตรวจคัดกรองเบื้องต้นและการตรวจแบบจำเพาะสำหรับ Line immunoassay (LIA) เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะหลายชนิดได้ในเวลาเดียว⁽¹⁷⁾ อย่างไรก็ตามหลักการ IIF ยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจวิเคราะห์หา ANA

Anti-smooth muscle antibodies (ASMA)

ASMA เป็นแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาต่อ cytoskeleton ได้แก่ actin, troponin, tropomyosin และ non-actin รวมทั้ง tubulin, vimentin, desmin และ skeleton มีความจำเพาะต่อโรค AIH-type 1 สูง ใช้หลักการ IIF คือ ทำการทดสอบโดยใส่น้ำเหลืองที่เจือจางเริ่มที่ 1 : 100 (ขึ้นอยู่กับแต่ละห้องปฏิบัติการ) โดยมี rat kidney, rat stomach และ primate liver เป็นเซลล์ตั้งต้น หลังทำปฏิกิริยาและล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกแล้วเติม fluorescence-conjugated anti-human IgG สำหรับตรวจติดตามปฏิกิริยา อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope)^(4, 6) (รูปที่ 1)

การติดสี apple-green fluorescence ในชิ้นเนื้อทั้ง 3 ชนิด

Stomach (rat): พบการเรืองแสงในส่วนของ lamina muscularis, blood vessel, muscle bundle และ/หรือ Tunica muscularis

Kidney (rat): พบการเรืองแสงในส่วนของ blood vessel (V), glomeruli (G), และ tubules (T) การติดสี fluorescence ในส่วนของ VG และ VGT จะมีความจำเพาะต่อโรค AIH มากกว่าติดสีเฉพาะส่วน V อีกทั้งการติดสีในส่วน VGT มีความสัมพันธ์กับ F-actin หรือ microfilament ซึ่งมีความจำเพาะต่อโรค AIH-type 1

Liver (monkey): พบการเรืองแสงในส่วน bicanalicular

นอกจากหลักการ IIF แล้ว ยังสามารถตรวจวิเคราะห์หา specific antibody ที่สำคัญ คือ anti F-actin ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AIH-type 1 ตรวจหาโดยใช้หลักการ EIA และ LIA ได้ แต่ยังไม่พบในผู้ป่วยที่ให้ผลลบต่อ ASMA ด้วยหลักการ IIF ยังสามารถให้ผลบวกต่อ anti F-actin ได้ ดังนั้นปัจจุบันยังถือว่าหลักการ IIF เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard)⁽⁴⁾ ในการตรวจวิเคราะห์โรคกลุ่มนี้

Anti-liver kidney microsome antibodies type-1 (anti-LKM1)

Anti-LKM1 เป็นแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาต่อเอนไซม์ cytochrome CYP2D6 มีความจำเพาะต่อโรค AIH-type 2 ใช้หลักการ IIF ทำการทดสอบโดยใส่น้ำเหลืองที่เจือจางเริ่มที่ 1 : 100 (ขึ้นอยู่กับแต่ละห้องปฏิบัติการ) มี rat kidney และ primate liver เป็นเซลล์ตั้งต้น หลังทำปฏิกิริยาและล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกแล้วเติม fluorescence-conjugated anti-human IgG ผลบวกจะเห็นสี apple-green fluorescence ในส่วนที่จำเพาะ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 2) โดยที่ rat kidney ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ส่วน proximal renal tubule และกระจายใน hepatocyte สำหรับใน stomach (rat) ไม่ติดในส่วน gastric parietal cell (GPC)⁽⁶⁾ นอกเหนือจากหลักการ IIF แล้ว ยังสามารถตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการ EIA และ LIA ได้

Anti-liver cytosol type 1 (anti-LC1)

Anti-LC1 เป็นแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาต่อเอนไซม์ formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD) จำเพาะต่อโรค AIH-type 2 ใช้หลักการ IIF ทำการทดสอบโดยใส่น้ำเหลืองที่เจือจางเริ่มที่ 1 : 100 (ขึ้นอยู่กับแต่ละห้องปฏิบัติการ) มี rat liver เป็นเซลล์ตั้งต้น หลังทำปฏิกิริยาและล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกแล้วเติม fluorescence-conjugated anti-human IgG ผลบวกจะเห็นสี apple-green fluorescence ในส่วนที่จำเพาะ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยที่ rat liver ติดสีฟลูออเรสเซนซ์รอบ centrilobular vein แต่จะไม่ติดสีใน renal tubules⁽⁶⁾ นอกเหนือจากหลักการ IIF แล้ว ยังสามารถตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการ EIA และ LIA ได้

Anti-soluble liver antigen/liver pancreas (Anti-SLA/LP)

Anti-SLP/LP เป็นแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อ O-Phosphoserine-tRNA (Sec) selenium transferase (tRNP^(ser)Sec) ใช้หลักการ EIA, LIA และ radioimmunoassay แต่ไม่สามารถทดสอบด้วยหลักการ IIF ได้ มีความจำเพาะต่อการเกิดโรค AIH สามารถพบได้ประมาณร้อยละ 20 – 30⁽⁶⁾

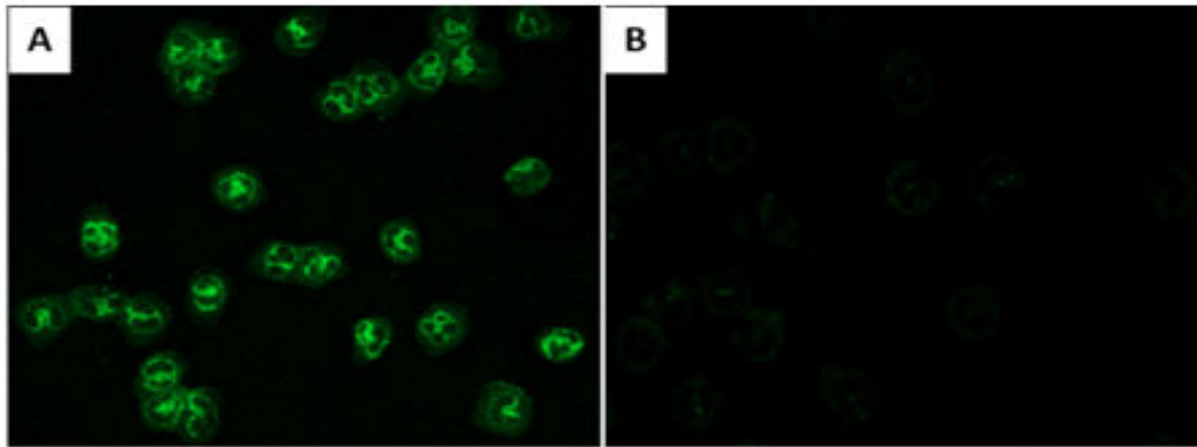


Figure 3. รูปภาพการติดสีฟลูออโรสแวง atypical perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) ใช้หลักการ IIF ใน neutrophil granule. (A) Ethanol fixed; (B) Formalin fixed.

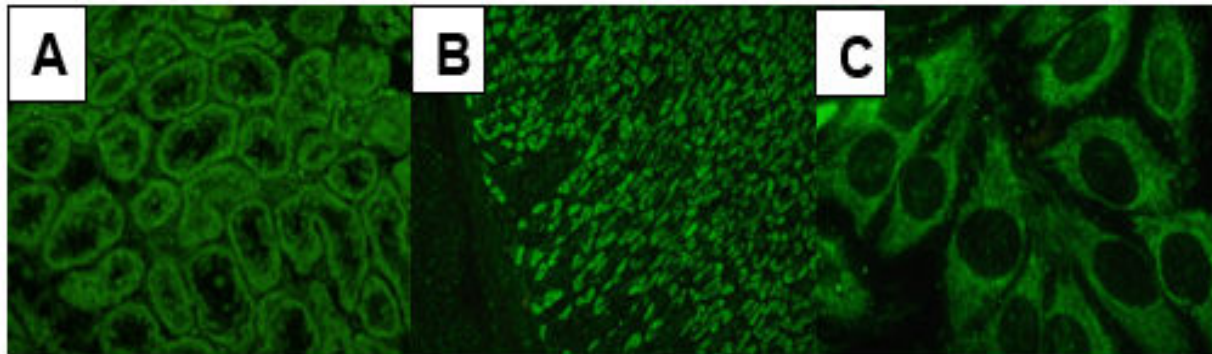


Figure 4. รูปภาพการติดสีฟลูออโรสแวง anti-mitochondria antibodies (AMA) ใช้หลักการ IIF ใน rat kidney, stomach และ HEp-2 cells. (A) proximal, distal และ collecting tubules ใน rat kidney; (B) gastric parietal cell ใน rat stomach; (C) cytoplasmic staining ใน HEp-2 cells.

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)

ANCA เป็นแอนติบอดีต่อส่วนไซโทพลาซึมของ neutrophil granule ใช้หลักการ IIF ในการตรวจวิเคราะห์ โดยทำการทดสอบโดยใส่น้ำเหลืองที่เจือจางเริ่มที่ 1 : 10 (ขึ้นอยู่กับแต่ละห้องปฏิบัติการ) โดยมี human granulocytes เป็นเซลล์ตั้งต้น หลังทำปฏิกิริยาและล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกแล้วเติม fluorescence-conjugated anti-human IgG สำหรับตรวจติดตามปฏิกิริยา อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ รูปแบบของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์มี 2 รูปแบบ คือ perinuclear (p-ANCA) มีแอนติเจนที่จำเพาะ คือ myeloperoxidase มักพบในผู้ป่วยโรค microscopic polyangiitis (MPA) และ cytoplasmic (c-ANCA) มีแอนติเจนที่จำเพาะ คือ proteinase 3 มักพบใน

ผู้ป่วยโรค Wegener granulomatosis

สำหรับในกลุ่มโรค AIH-type 1, PSC และโรคลำไส้อักเสบ มักตรวจพบ atypical p-ANCA (รูปที่ 3) แต่ไม่พบใน AIH-type 2 มีแอนติเจนที่จำเพาะหลากหลายชนิด ได้แก่ catalase, enolase, cathepsin G และ bacterial permeability-increasing protein (BPI) เป็นต้น แม้ว่า atypical p-ANCA จะมีความจำเพาะต่ำ แต่มีความสำคัญในการวินิจฉัยโรค AIH โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ไม่พบอโตแอนติบอดีชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตาม atypical p-ANCA เป็นแอนติบอดีสำคัญที่ตรวจพบในผู้ใหญ่ที่เป็นโรค PSC / autoimmune sclerosing cholangitis (ASC) ได้^(9, 18, 19)

Table 3. ลักษณะสำคัญของอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจพบในผู้ป่วย primary biliary cirrhosis. ⁽²⁰⁾

ชนิดแอนติบอดี	IIF pattern	Sensitivity (%)	Specificity	โรคอื่นๆ ที่พบได้	ความสำคัญทางคลินิก
Anti-mitochondria Ab	MIT	90 - 95	High	None	ช่วยในการวินิจฉัย PBC
Anti-PDC-E2 (74 kDa)	MIT	80 - 90	High	None	แต่ไม่พบความแตกต่าง
Anti-PDC-E3BP (50 kDa)	MIT	10	High	None	ของลักษณะทางคลินิก
Anti-PDC-E1a (41 kDa)	MIT	5 - 25	High	None	ในผู้ป่วยที่มี AMA-
Anti-OGDC-E2 (48 kDa)	MIT	20 - 60	High	None	positive และ AMA-
Anti-BCOADC-E2 (52 kDa)	MIT	50 - 80	High	None	negative
Anti-nuclear Ab		40 - 50	ขึ้นกับชนิดของแอนติเจน		
Anti-gp210	NM	10 - 40	Very high	None	ช่วยในการวินิจฉัย AMA-
Anti-p62	NM	10 - 30	High	Sjögren syndrome	negative PBC
Anti-lamin B receptor	NM	2 - 9	High	None	ช่วยในการวินิจฉัย AMA-
Anti-sp100	MND	20 - 40	High	None	negative PBC
Anti-PML	MND	15 - 20	High	None	
Anti-sp140	MND	15	High	None	ช่วยในการวินิจฉัย AMA-
Anti-SUMO-1,2	MND	2 - 6	High	None	negative PBC
Anti-centromere A, B, C	CENP	10 - 30	Not high	Systemic sclerosis	Portal hypertension-type progression

IIF, Indirect immunofluorescence with HEp-2 cell; MIT, mitochondria pattern; NM, nuclear membranous; MND, multiple nuclear dot; CENP, centromere pattern, AMA: Anti-mitochondria antibodies.

Anti-mitochondria antibodies (AMA)

AMA เป็นแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อ E2 subunit ของ pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2), E2 subunit ของ branched chain oxoacid dehydrogenase complex (BCOADC-E2), E2 subunit ของ oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDC-E2), E1a pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E1a), E3 binding protein subunit ของ pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E3BP) (ตารางที่ 3) ซึ่งมีความจำเพาะต่อโรค PBC โดยในการตรวจหา AMA นั้น จะใช้หลักการ IIF คือ ทำการทดสอบโดยใส่น้ำเหลืองที่เจือจางเริ่มที่ 1 : 100 (ขึ้นอยู่กับแต่ละห้องปฏิบัติการ) โดยมี rat kidney, rat stomach และ/หรือ เซลล์ HEp-2 เป็นเซลล์ตั้งต้น หลังทำปฏิกิริยาและล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกแล้วเติม fluorescence-conjugated anti-human IgG สำหรับตรวจติดตามปฏิกิริยาอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 4) ⁽¹⁴⁾

การติดสี apple-green fluorescence ในชิ้นเนื้อทั้ง 3 ชนิด

Kidney (rat): พบการเรืองแสงในส่วน cortical region, medullar renal region และติดในส่วน proximal, distal และ collecting tubules

Stomach (rat): พบการเรืองแสงในส่วน gastric parietal cell (GPC)

เซลล์ HEp-2: พบการเรืองแสงในส่วนไซโทพลาซึม แบบจำเพาะเรียก strand of beads

นอกเหนือจากหลักการ IIF แล้วยังสามารถตรวจหา specific antibody ชนิดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องด้วยหลักการ EIA และ LIA ได้

สรุป

ALD เป็นกลุ่มโรคตับอักเสบ ที่เกิดจากภูมิคุ้มกันตนเองเข้าไปทำลายเซลล์ตับ กลุ่มโรค ALD ที่สำคัญ ได้แก่ autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis (PBC) และ primary sclerosing cholangitis (PSC) เป็นต้น สาเหตุการเกิดโรคที่ไม่ชัดเจน รวมทั้งอาการทางคลินิกที่ไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้การตรวจหาออโตแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องต่อโรคตับจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการวินิจฉัยกลุ่มโรค ALD ออโตแอนติบอดีแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อกลุ่มโรคที่แตกต่างกัน ตัวชี้วัดทางน้ำเหลืองที่สำคัญ ได้แก่ ANA มักใช้หลักการ IIF ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ พบได้ในโรค AIH และ PBC เป็นส่วนใหญ่ ในกลุ่มโรค AIH-type 1 มีออโตแอนติบอดีจำเพาะที่เกี่ยวกับ ANA น้อย ส่วนใหญ่พบรูปแบบการเรียงแสงเป็น homogeneous ส่วน speckled พบได้น้อย การตรวจหา ANA แม้จะมีความสำคัญ แต่มีความจำเพาะต่ำต่อการวินิจฉัยโรค AIH ในขณะที่โรค PBC การตรวจหา ANA มีประโยชน์มากในกรณีที่ตรวจไม่พบ AMA (มีความจำเพาะสูงต่อโรค PBC) แต่ ANA ให้ผลบวกจึงสามารถช่วยวินิจฉัยโรคได้ เนื่องจากแอนติบอดีหลายชนิดมีรูปแบบการเรียงแสงที่จำเพาะ ได้แก่ nuclear membrane, multiple nuclear dot และ centromere ปังชี้ถึงแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรค PBC คือ anti-gp210, anti-sp100 และ anti-centromere เป็นต้น ส่วนการตรวจหา ASMA ใช้หลักการ IIF มีความจำเพาะต่อโรค AIH-type 1 สูง จึงมีประโยชน์ในด้านการวินิจฉัยโรคและมีแอนติบอดีที่จำเพาะ คือ anti F-actin อีกทั้งพบว่า AIH-type 1 ให้ผลบวกร่วมกันของ ANA และ ASMA ได้ ในขณะที่ anti-LKM 1 และ anti-LC 1 มีประโยชน์ในด้านการวินิจฉัยโรค AIH-type 2 ตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งหลักการ IIF, EIA และ LIA ส่วน anti-SLA/LP ตรวจหาโดยใช้หลักการ EIA และ LIA (ไม่สามารถตรวจด้วยหลักการ IIF ได้) แม้ว่าจะตรวจพบในโรค AIH ร้อยละ 20-30 แต่มีความสำคัญในการวินิจฉัยโรค AIH ควบคู่ไปกับ atypical p-ANCA ในกรณีที่ผู้ป่วยให้ผลลบต่อออโตแอนติบอดีอื่น ๆ แต่สงสัยว่าเป็น AIH ควรส่งตรวจทั้ง anti-SLA/LP และ ANCA นอกจากนี้ atypical p-ANCA ยังเป็นออโตแอนติบอดีที่สำคัญต่อโรค PSC และสามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิดนี้ในโรคชนิดอื่น ๆ ได้เช่นกัน แม้ว่า atypical p-ANCA มีความจำเพาะต่ำ แต่มีความสำคัญในการวินิจฉัยโรค PSC และการตรวจหา AMA ใช้หลักการ IIF มีความจำเพาะสูงในการวินิจฉัยโรค PBC ส่วนการตรวจหา

แอนติบอดีที่จำเพาะอื่น ๆ ต่อโรค PBC สามารถตรวจหาโดยใช้หลักการ EIA และ LIA ได้

สรุปได้ว่าการตรวจวิเคราะห์ทางน้ำเหลือง เพื่อหาออโตแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องกับโรคตับเป็นสิ่งสำคัญต่อการวินิจฉัยกลุ่มโรค ALD ที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ สามารถจำแนกกลุ่มโรค ALD ที่เป็นต้นเหตุได้ชัดเจน เป็นประโยชน์ต่อแนวทางการรักษาของแพทย์ซึ่งออโตแอนติบอดีแต่ละชนิดมีข้อดี ข้อเสีย และข้อจำกัดที่แตกต่างกัน ฉะนั้นการเลือกตรวจด้วยการทดสอบใด อยู่ที่เหมาะสม และประโยชน์ที่ได้จากการทดสอบนั้น ๆ รวมทั้งมีส่วนช่วยลดความจำเป็นในการตัดชิ้นเนื้อตับ ลดค่าใช้จ่าย และลดการบาดเจ็บจากการผ่าตัดของผู้ป่วยได้เพิ่มมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Liberal R, Grant CR, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis: a comprehensive review. *J Autoimmun* 2013;41:126-39.
2. Muratori L, Lohse AW, Lenzi M. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *BMJ* 2023; 380:e070201.
3. Washington MK. Autoimmune liver disease: overlap and outliers. *Mod Pathol* 2007;20 Suppl 1:S15-30.
4. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2013;46:17-24.
5. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;51:2193-213.
6. Cancado EL, Abrantes-Lemos CP, Terrabuio DR. The importance of autoantibody detection in autoimmune hepatitis. *Front Immunol* 2015;6:222.
7. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis: serum autoantibodies in clinical practice. *Clin Rev Allergy Immunol* 2022;63: 124-37.
8. Mack CL, Adams D, Assis DN, Kerkar N, Manns MP, Mayo MJ, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis in adults and children: 2019 practice guidance and guidelines from the American

- Association for the study of liver diseases. *Hepatology* 2020;72:671-722.
9. Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol* 2008;14: 3374-87.
 10. Mieli-Vergani G, Vergani D, Czaja AJ, Manns MP, Krawitt EL, Vierling JM, et al. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:1-21.
 11. Cancado EL, Harritz M. The importance of autoantibody detection in primary biliary cirrhosis. *Front Immunol* 2015;6:309.
 12. Nguyen HH, Fritzler MJ, Swain MG. A review on biomarkers for the evaluation of autoimmune cholestatic liver diseases and their overlap syndromes. *Front Mol Med* 2022;2:914505.
 13. Richardson N, Ng STH, Wraith DC. Antigen-specific immunotherapy for treatment of autoimmune liver diseases. *Front Immunol.* 2020;11:1586.
 14. Norman GL, Bizzaro N, Villalta D, Vergani D, Mieli-Vergani G, Hirschfield GM, et al. Chapter 6 - The evolving potential of precision medicine in the management of autoimmune liver disease. In: Mahler M, editor. *Precision medicine and artificial intelligence*. San Diego, CA: Academic Press; 2021. p. 135-67.
 15. Ben-Ami Shor D, Papageorgiou NP, Shoenfeld Y. Chapter 3 - Autoantibodies in gastrointestinal autoimmune diseases. In: Ramos-Casals M, Khamashta M, Britó-Zeron P, Atzeni F, Teixidor JR, editors. *Handbook of systemic autoimmune diseases*. Vol. 13. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 49-66.
 16. Dalekos GN, Gatselis NK. Autoimmune serology testing in clinical practice: an updated roadmap for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Eur J Intern Med* 2023;108:9-17.
 17. Thammacharoenrach N, Kaewopas Y. Detection of antinuclear antibodies in laboratory. *J Med Biosci* 2022;4:103-17.
 18. Terjung B, Spengler U. Atypical p-ANCA in PSC and AIH: a hint toward a "leaky gut"? *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;36:40-51.
 19. Terjung B, Spengler U, Sauerbruch T, Worman HJ. "Atypical p-ANCA" in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 2000;119:310-22.
 20. Nakamura M. Clinical significance of autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2014;34: 334-40.