

Proportion of Patients with Negative Nuclear Pattern by Antinuclear Antibody Test and Characteristics of Specific Antibodies Detected

Wisansanee Karoonboonyanan^{1*}, Kittikorn Duangkum², Pimchanok Tantiwong²,
Sarassawan Kananuraks³, Manasita Tanya⁴, Winyou Wongpratoon⁵
and Warayuwadee Amornpinyo⁶

¹Department of Medical Technology, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand

²Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Khon Kaen Hospital,
Khon Kaen Province, Thailand

³Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Khon Kaen Hospital,
Khon Kaen Province, Thailand

⁴Division of Rheumatology, Department of Pediatrics, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand

⁵Unit of Clinical Immunology, Division of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Science,
Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand

⁶Division of Dermatology, Department of Internal Medicine, Khon Kaen Hospital,
Khon Kaen Province, Thailand

Abstract

Autoantibodies might be undetected in some autoimmune-suspected patients, by both antinuclear antibodies (ANAs) screening test and specific antibodies detection. This work aimed to evaluate the proportion of negative ANA nuclear results and to study the detection rates and types of specific antibodies detected, along with the clinical diagnosis of these patients. The laboratory records of patients in Khon Kaen Hospital who were suspected of autoimmune rheumatic diseases (ARDs) by clinicians and underwent ANA test using indirect immunofluorescence assay (IFA) and specific antibody detection by line immunoblot assay (LIA) were reviewed. The retrospective data were collected and investigated from 2017-2020 and the patients with negative ANA nuclear pattern were selected for analysis of clinical diagnosis. The data were analyzed using descriptive statistics, chi-square test or Fisher's exact test. Out of 1,002 cases of serum samples, 127 (12.7%) were found with negative nuclear pattern of ANA. In this group, positive cytoplasmic staining patterns could suggest the tendency of specific antibodies detection ($p < 0.001$), that is, from 16.5% (21/127) positive cases, 61.9% (13/21) were found with specific

*Corresponding author E-mail address: t.wisansanee@gmail.com

antibodies, while in the remaining 83.5% (106/127) negative cases, only 14.2% (15/106) were detected. This is also true for the tendency of diagnosis as ARD ($p = 0.001$), that is, the positive cytoplasmic cases were diagnosed as ARD by 71.4% (15/21), compared to only 32.1% (34/106) for the negative cases. However, positive mitotic staining patterns could not suggest such tendencies. When at least one cytoplasmic pattern was positive, detection of specific antibodies led to higher proportion of ARD diagnosis, i.e., from 71.4% (15/21) with only ANA considered to 92.3% (12/13) when specific antibodies were also detected. The most frequent specific antibodies detected were anti-Ro52 (73.3%; 11/15) and anti-SSA (40.0%; 6/15), mostly with high intensity. In contrast, when cytoplasmic patterns were negative, proportions of ARD were similar whether specific antibodies were detected or not, i.e., 33.3% (5/15) when detected, and 31.9% (29/91) when not, suggesting that specific antibodies detection could not distinguish between ARD and non-ARD clearly in this case. Additionally, intensity of specific antibodies found in non-ARD was likely low. The most frequently found disease in patients with negative nuclear pattern of ANA was SLE. The investigation suggested that positive cytoplasmic patterns together with specific antibodies detection were more likely to lead to SLE diagnosis than in the other groups (30.8%; 4/13). However, cases of SLE were too few to be statistically concluded. In conclusion, when the result of ANA screening test is negative for nuclear patterns, positive cytoplasmic patterns can help suggest ARD when combined with specific antibodies detection. Patient clinical symptoms should also be considered altogether.

Keywords: Autoimmune rheumatic disease, Indirect immunofluorescence assay, Negative ANA nuclear pattern, Specific antibody

สัดส่วนของผู้ป่วยที่มีผลเป็นลบต่อ Nuclear Pattern ของการตรวจ Antinuclear Antibody และลักษณะ ของแอนติบอดีจำเพาะที่ตรวจพบ

วิสันสนีย์ การุญบุญญานันท์^{1*} กิตติกร ดวงคำ² พิมพ์ชนก ตันติวงส์² สรัสวดี คณานุรักษ์³
มนสิตา ตันยะ⁴ วิญญู วงศ์ประทุม⁵ และ วรายุวดี อมรภิญโญ⁶

¹กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

²หน่วยโรคข้อและรูมาติสซั่ม กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

³หน่วยโรคไต กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

⁴หน่วยโรคข้อและรูมาติสซั่ม กลุ่มงานกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

⁵กลุ่มวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

⁶หน่วยผิวหนัง กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกเข้าข่ายเป็นโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเองบางส่วนอาจตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเอง ทั้งในการตรวจคัดกรอง antinuclear antibody (ANA) และการตรวจแอนติบอดีจำเพาะ การศึกษานี้ต้องการประมาณสัดส่วนของผลตรวจ ANA ที่เป็นลบในนิวเคลียส และศึกษาอัตราการตรวจพบและชนิดของแอนติบอดีจำเพาะ รวมทั้งผลการวินิจฉัยโรคทางคลินิก โดยสืบค้นผลตรวจทางห้องปฏิบัติการย้อนหลังของผู้ป่วยในโรงพยาบาลขอนแก่นที่แพทย์สงสัยภาวะภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเองและส่งตรวจ ANA ด้วยวิธีอินโดเรคิมนูโนฟลูออเรสเซนซ์ และตรวจแอนติบอดีจำเพาะด้วยวิธี line immunoblot assay (LIA) ในช่วง พ.ศ. 2560-2563 และสืบค้นเวชระเบียนเฉพาะของผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ ANA เป็นลบในนิวเคลียส เพื่อรวบรวมผลการวินิจฉัยโรค วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา สถิติ chi-square test หรือ Fisher's exact test ผลการศึกษาพบว่า จากตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย 1,002 ราย มีผล ANA เป็นลบในนิวเคลียส 127 ราย (ร้อยละ 12.7) ซึ่งในกลุ่มนี้การติดสีในไซโทพลาสซึมสามารถบ่งชี้แนวโน้มการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะได้ ($p < 0.001$) โดยในร้อยละ 16.5 (21/127) ที่ติดสี พบแอนติบอดีจำเพาะถึงร้อยละ 61.9 (13/21) ในขณะที่อีกร้อยละ 83.5 (106/127) ที่ไม่ติดสี พบแอนติบอดีจำเพาะเพียงร้อยละ 14.2 (15/106) และการติดสีในไซโทพลาสซึมยังสามารถบ่งชี้แนวโน้มการวินิจฉัยว่าเป็นผู้ป่วยโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเอง ($p = 0.001$) ได้อีกด้วย โดยในกลุ่มที่ติดสีได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกลุ่มนี้ถึงร้อยละ 71.4 (15/21) ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ติดสีพบเพียงร้อยละ 32.1 (34/106) แต่การติดสีในไมโทติคเซลล์ไม่สามารถบ่งชี้แนวโน้มทั้งสองได้ เมื่อพิจารณา

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: t.wisansanee@gmail.com

รับบทความ: 22 กุมภาพันธ์ 2565

แก้ไขบทความ: 10 เมษายน 2565

รับตีพิมพ์บทความ: 3 พฤษภาคม 2565

การติดสีในไขโทพลาสซึมร่วมกับการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ พบว่า ในกลุ่มที่ติดสีในไขโทพลาสซึม การตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะด้วยนำไปสู่การวินิจฉัยว่าเป็นโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเองในสัดส่วนที่สูงขึ้น คือจากร้อยละ 71.4 (15/21) เมื่อดูเฉพาะผล ANA เป็นร้อยละ 92.3 (12/13) เมื่อพบแอนติบอดีจำเพาะด้วย ซึ่งแอนติบอดีจำเพาะที่ตรวจพบมากที่สุด ได้แก่ anti-Ro52 พบร้อยละ 73.3 (11/15) และ anti-SSA พบร้อยละ 40.0 (6/15) และส่วนใหญ่มีความเข้มสูง สำหรับกลุ่มที่ไม่ติดสีในไขโทพลาสซึม มีสัดส่วนของผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเองใกล้เคียงกันทั้งในกลุ่มที่พบและไม่พบแอนติบอดีจำเพาะ คือร้อยละ 33.3 (5/15) ในกลุ่มที่พบ และร้อยละ 31.9 (29/91) ในกลุ่มที่ไม่พบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตรวจพบหรือไม่พบแอนติบอดีจำเพาะในกลุ่มที่ไม่ติดสีในไขโทพลาสซึมอาจไม่ช่วยแบ่งแยกผู้ป่วยที่เป็นและไม่เป็นโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเองให้ชัดเจนขึ้นได้ โดยความเข้มของแอนติบอดีจำเพาะที่พบในผู้ป่วยที่ไม่ใช่โรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเองส่วนใหญ่มีระดับต่ำ โรคที่พบมากที่สุดในการตรวจพบผล ANA เป็นลบในนิวเคลียส คือ SLE ซึ่งการติดสีในไขโทพลาสซึมและการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะมีโอกาสนำไปสู่การวินิจฉัยว่าเป็น SLE ได้มากกว่ากลุ่มอื่น (ร้อยละ 30.8; 4/13) แต่จำนวนที่ตรวจพบยังน้อยเกินกว่าจะสรุปในทางสถิติได้ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า ในการตรวจคัดกรอง ANA ที่ได้ผลเป็นลบในนิวเคลียส การติดสีในไขโทพลาสซึมเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่ช่วยบ่งชี้โรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเองได้เมื่อใช้ประกอบกับการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ โดยควรพิจารณาอาการทางคลินิกของผู้ป่วยร่วมด้วย

คำสำคัญ: โรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเอง วิธีอินไดเรคติมูโนฟลูออเรสเซนซ์ แอนตินิวเคลียร์แอนติบอดี เป็นลบในนิวเคลียส แอนติบอดีจำเพาะ

บทนำ

การตรวจแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเอง (auto-antibody) ด้วยการตรวจ antinuclear antibodies (ANAs) เป็นการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยกลุ่มโรค autoimmune rheumatic diseases (ARDs) โดยเฉพาะ systemic autoimmune diseases รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue diseases; CTDs) ได้แก่ systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), systemic sclerosis (SSC), polymyositis/dermatomyositis และ mixed connective tissue disease (MCTD) เป็นต้น⁽¹⁾ โดยปัจจุบัน The American College of Rheumatology (ACR) ได้แนะนำว่าการตรวจ ANA ด้วยวิธี indirect immunofluorescence assay (IFA) ยังคงเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจคัดกรองแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเอง⁽²⁾

การรายงานผลการตรวจ ANA ประกอบด้วยรูปแบบของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ในนิวเคลียส (nuclear pattern) ในไซโทพลาสซึม (cytoplasmic pattern) และไมโทติกเซลล์ (mitotic pattern) โดยแต่ละรูปแบบมีความสัมพันธ์กับแอนติเจนที่จำเพาะ รวมทั้งมีความเกี่ยวข้องกับโรคภูมิคุ้มกันตนเองหลาย ๆ ชนิด⁽³⁾ จากที่ประชุม The international consensus on ANA patterns (ICAP) workshop ครั้งที่ 2 ในปี พ.ศ. 2558 ได้มีการทบทวนข้อตกลงร่วมกันในการรายงานผล ANA ด้วยหลักการ IFA โดยแนะนำว่าควรประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ ชนิดของวิธีทดสอบ ผลการตรวจ ANA ที่ควรระบุให้ผลเป็นบวกหรือลบ และรายงานรูปแบบของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ หรือ ANA patterns ตามด้วยระดับของแอนติบอดีในรูปแบบไตเตอร์ หรือระดับความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์

(fluorescence intensity) โดยควรมีข้อเสนอแนะของผลการตรวจ ANA กับความสัมพันธ์ของการตรวจพบแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่จำเพาะ (specific antibody) ในโรคที่เกี่ยวข้อง⁽⁴⁾

โดยปกติเมื่อตรวจพบ nuclear pattern ก็จจะรายงานผล ANA เป็นบวก แต่ในกรณีที่ไมพบ nuclear pattern ยังไม่มีข้อสรุปว่าควรรายงานผล ANA เป็นบวกหรือลบหากตรวจพบ cytoplasmic pattern หรือ mitotic pattern แม้จะเป็นที่เข้าใจร่วมกันว่าการติดสีทั้งสองแบบนี้ภายในเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับอาการทางคลินิกของโรคบางชนิด และเป็นสิ่งที่ไม่ควรมองข้าม^(4,5) อย่างไรก็ตาม มีข้อเสนอแนะระดับนานาชาติสำหรับการตรวจแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเองว่านอกเหนือจากการรายงาน nuclear pattern ควรรายงานชนิดของ cytoplasmic pattern และ mitotic pattern ร่วมด้วย และในกรณีที่ ANA ให้ผลเป็นบวก (โดยไม่ได้ลงรายละเอียดว่านับการตรวจพบ cytoplasmic pattern หรือ mitotic pattern ในกรณีที่ไมพบ nuclear pattern ด้วยหรือไม่) ให้ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่มีความจำเพาะสำหรับ extractable nuclear antigens (ENAs) ซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะ⁽⁶⁾ โดยแอนติบอดีต่อ ENA แต่ละชนิด (anti-ENA) ได้แก่ anti-nRNP/Sm, anti-Sm, anti-SSA, anti-Ro52, anti-SSB, anti-Scl70 และ anti-Centromere เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดอื่นในส่วนนิวเคลียส เช่น anti-dsDNA, anti-histones และ anti-nucleosomes แอนติบอดีต่อแอนติเจนในไซโทพลาสซึม เช่น anti-Jo1 และ anti-RIB-P และแอนติบอดีต่อไมโทติกเซลล์หรือเซลล์ระยะแบ่งตัวซึ่งแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเองเหล่านี้มีรายงานการตรวจพบและสัมพันธ์กับโรค CTD หลายชนิด⁽⁷⁾

จากแนวทางปฏิบัติในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเซลล์

ตนเอง ได้ระบุให้ตรวจ ANA เฉพาะในผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกซึ่งสงสัยกลุ่มโรค ARD และตรวจ antinuclear specific antibody เฉพาะในผู้ป่วยที่มีผลตรวจ ANA ด้วยวิธี IFA เป็นบวก หรือมีอาการทางคลินิกของโรค ARD ชัดเจนแม้จะมีผล ANA เป็นลบ⁽⁸⁾ โดยจากการศึกษาของ Pollock และคณะ ในปี พ.ศ. 2542 ได้รายงานผลตรวจ anti-SSA ซึ่งเป็นหนึ่งใน anti-ENA ที่มักจะไม่มี ANA pattern ปรากฏให้เห็นในการย้อมด้วยวิธี IFA โดยตัวอย่างซีรัมที่ตรวจพบ anti-SSA เมื่อตรวจ ANA ด้วยวิธี IFA โดยใช้ HEp-2 cells เป็นแอนติเจน ให้ผล ANA เป็นลบถึงร้อยละ 6 ซึ่งแสดงว่าการตรวจคัดกรอง ANA ที่ให้ผลเป็นลบไม่ได้หมายความว่าผู้ป่วยจะไม่มีแอนติบอดีจำเพาะ⁽⁹⁾ โดยเฉพาะกลุ่มโรค ARD บางชนิด เช่น SLE, polymyositis และ rheumatoid arthritis ที่เมื่อตรวจ ANA โดยใช้ HEp-2 cells หรือ HEp-2000 cells เป็นแอนติเจน และได้ผลเป็นลบ ก็สามารถตรวจพบ anti-ENA บางชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคได้⁽¹⁰⁾

ในปี พ.ศ. 2562 The European League Against Rheumatism (EULAR) และ ACR ได้ปรับเกณฑ์การจำแนกชนิดของโรค SLE โดยกำหนดให้การตรวจ ANA ด้วยวิธี IFA โดยใช้ HEp-2 cells ที่มีผลเป็นบวกและไตเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 1:80 เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเข้าสู่กระบวนการวินิจฉัยโรค SLE (entry criterion) โดยพิจารณาร่วมกับผลตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาและอาการทางคลินิก⁽¹¹⁾ อย่างไรก็ตาม หลายการศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานผู้ป่วย SLE ที่มีผลตรวจคัดกรอง ANA ด้วยวิธี IFA เป็นลบ แต่ตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ เช่น Marais และคณะ ได้รายงานการพบผู้ป่วย ANA negative SLE ที่มีอาการทางคลินิกของโรค SLE ชัดเจน แต่ตรวจพบ anti-SSA⁽¹²⁾ Sugisaki และคณะ รายงานผู้ป่วย SLE ที่เป็น Lupus nephritis ซึ่งมี ANA

เป็นลบ แต่ตรวจพบ cytoplasmic specific antibody ชนิด anti-Ribosomal P protein (anti-RIB-P)⁽¹³⁾ Song และคณะ รายงานผู้ป่วย SLE 15 ราย ที่มีผลตรวจ ANA เป็นลบ โดยมีบางส่วนที่ตรวจพบ anti-SSA และ/หรือ anti-SSB รวมทั้งกลุ่มที่มีผล anti-ENA เป็นลบ⁽¹⁴⁾ โดยผู้ป่วย SLE ที่เป็น seronegative lupus nephritis ก็มีรายงานพบว่ามีผลตรวจ ANA และ anti-ENA เป็นลบ^(15, 16) นอกจากนี้ Chander และคณะ ได้รายงานผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค systemic sclerosis ซึ่งมีอาการทางคลินิกที่ชัดเจนโดยอ้างอิงตาม ACR/EULAR score สำหรับโรค systemic sclerosis โดยพบว่าผู้ป่วยมีผลตรวจ ANA, anti-Scl70 และ anti-centromere เป็นลบ⁽¹⁷⁾

จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกของ ARD โดยเฉพาะ SLE บางส่วนอาจตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเอง ทั้งการตรวจคัดกรอง ANA ด้วยวิธี IFA และการตรวจแอนติบอดีจำเพาะ อีกทั้งยังเป็นข้อมูลรายงานการพบผู้ป่วยซึ่งเป็น case report ยังไม่ทราบถึงสัดส่วนของการตรวจพบ ANA ที่ให้ผลเป็นลบในส่วนของนิวเคลียส และการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะแต่ละชนิดสำหรับผู้ป่วยที่สงสัยภาวะภูมิคุ้มกันตนเองเนื้อเยื่อตนเองชนิดอื่นๆ ที่อาจเป็นผู้ป่วย ARD หรือโรคชนิดอื่นได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประมาณสัดส่วนของ ANA ที่ให้ผลเป็นลบในส่วนของนิวเคลียส ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยภาวะภูมิคุ้มกันตนเองเนื้อเยื่อตนเองและส่งตรวจ ANA และ anti-ENA และศึกษาอัตราการตรวจพบและชนิดของแอนติบอดีจำเพาะแต่ละชนิด รวมทั้งผลการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยที่มี ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส เพื่อให้สามารถนำผลการวิเคราะห์มาช่วยสนับสนุนการวินิจฉัย และการทำนายโรคในผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกที่สงสัยภาวะภูมิคุ้มกันตนเองเนื้อเยื่อตนเอง

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้มีรูปแบบการวิจัยแบบ retro-spective descriptive study โดยการสืบค้นข้อมูลย้อนหลังของทะเบียนบันทึกผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยภาวะภูมิคุ้มกันต้านเนื้อเยื่อตนเอง และส่งตรวจ ANA และ anti-ENA จำนวน 1,002 ราย และศึกษาผลการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยที่มี ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส จากเวชระเบียนของผู้ป่วยโรงพยาบาลขอนแก่น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 ถึง 2563 โครงการวิจัยนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลขอนแก่น รหัสโครงการวิจัย KEXP63002

2. การตรวจวิเคราะห์ antinuclear antibodies (ANAs)

ตรวจวิเคราะห์ ANA ด้วยวิธี IFA โดยใช้ชุดน้ำยาส่งสำเร็จรูปยี่ห้อ EUROIMMUN (Germany) ซึ่งใช้ซับสเตรตที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human laryngo-epithelium cells (HEp-20-10 cells) และ primate liver cells (monkey's liver cells) เคลือบบนแผ่นสไลด์ ย้อมสไลด์เพื่อตรวจหา ANA โดยเจือจางซีรัมผู้ป่วยเป็น single dilution ที่ 1:100 ด้วย phosphate buffer saline (PBS)-Tween 20 ตามข้อแนะนำในเอกสารกำกับน้ำยา เติมซีรัมที่เจือจางแล้วให้ทำปฏิกิริยากับซับสเตรตแอนติเจน โดยบ่ม (incubate) ไว้ 30 นาที เพื่อให้แอนติบอดีที่คาดว่าจะมีในซีรัมทำปฏิกิริยากับซับสเตรตแอนติเจนที่เคลือบบนแผ่นสไลด์ แล้วล้างซีรัมส่วนเกินออก จากนั้นเติมน้ำยา fluorescein-labelled anti-human IgG (goat) เพื่อติดตามการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยบ่มไว้อีก 30 นาที และล้างส่วนเกินออก ตรวจวิเคราะห์การติดสีฟลูออเรสเซนซ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยรายงานผล

เป็นบวกหรือลบ หากพบการติดสีก็จำแนกชนิด ANA pattern และประเมินระดับความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) จาก 1+ ถึง 4+ โดยไม่ได้รายงานผลเป็นไคเตอร์

แต่ละสไลด์จะทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control; IQC) ที่มีผลเป็นลบและเป็นบวกของ nuclear homogeneous pattern ที่มีระดับความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ 4+ ควบคู่กันไปด้วย ทั้งนี้เพื่อทดสอบคุณภาพของน้ำยาและกระบวนการย้อม และเพื่อใช้อ่านเทียบความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์เป็นการควบคุมความแตกต่างของการอ่านระดับความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการย้อมแต่ละครั้ง

3. การตรวจวิเคราะห์ anti-extractable nuclear antigens (anti-ENAs)

ย้อมแผ่น immunostrip ซึ่งเคลือบแอนติเจนชนิด nRNP/Sm, Sm, SSA (Ro), Ro-52, SSB (La), Scl-70, Jo-1, centromere B, dsDNA, nucleosomes, histones และ RIB-P ตามขั้นตอนในเอกสารกำกับน้ำยาของชุดน้ำยาส่งสำเร็จรูปสำหรับตรวจ anti-ENA วิธี line immunoblot assay (LIA) ชนิด EUROLINE ANA Profile 1 (IgG) ยี่ห้อ EUROIMMUN (Germany) โดยเจือจางตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยเป็น 1:100 ด้วย sample buffer แล้วบ่ม 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจำเพาะที่คาดว่าจะมีในซีรัม ล้างซีรัมส่วนเกินออก เติมน้ำยา enzyme conjugate ซึ่งเป็น alkaline phosphatase-labelled anti-human IgG (goat) โดยบ่มไว้ 30 นาที และล้างส่วนเกินออก ขั้นตอนสุดท้ายเติมซับสเตรต ได้แก่ Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/BCIP) บ่ม 10 นาที และ

หยุดปฏิกิริยาดำเนินการ น้ำกลั่น ซีรัมผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีจำเพาะจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแต่ละชนิดที่เคลือบไว้บนแผ่น immunostrip และปรากฏแถบสีให้เห็น อ่านระดับความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก ในรูปแบบกึ่งเชิงปริมาณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป EUROLinScan โดยรายงานผลเป็น negative, borderline, positive 1+, positive 2+ และ positive 3+ (strong positive) ข้อมูลในการศึกษานี้ไม่ได้รายงานผลเป็นไคเตอร์

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ประมาณสัดส่วนของผลตรวจ ANA ที่เป็นบวกและลบในส่วนของนิวเคลียส ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่สงสัยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องตนเอง เป็นค่าร้อยละ

จากนั้น ศึกษาเฉพาะกลุ่มที่ผลตรวจ ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส โดยเปรียบเทียบสัดส่วนของผลการตรวจเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของการตรวจ ANA การตรวจแอนติบอดีจำเพาะ และการวินิจฉัยโดยแพทย์ว่าเป็นกลุ่มโรค ARD หรือไม่ โดยใช้สถิติ chi-square หรือ Fisher's exact test ช่วยในการตัดสินใจ รวมทั้งประมาณค่าความถี่ร้อยละของแอนติบอดีจำเพาะแต่ละชนิดที่พบ และความถี่ของโรคที่พบในผู้ป่วย

ผลการศึกษา

จากการสืบค้นทะเบียนบันทึกผลตรวจคัดกรอง ANA ด้วยวิธี IFA ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องตนเองและส่งตรวจ anti-ENA จำนวน 1,002 ราย พบผู้ป่วยที่มีผล ANA เป็นบวกในส่วนของนิวเคลียส 875 ราย คิดเป็นร้อยละ 87.3 และ ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส 127 ราย คิดเป็นร้อยละ 12.7 (Table 1)

1. การตรวจวิเคราะห์ ANA

ผู้ป่วยที่มีผล ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส เมื่อพิจารณาเฉพาะผลการตรวจ cytoplasmic pattern หรือ mitotic pattern ที่มีต่อการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ และต่อการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยว่าจัดอยู่ในกลุ่ม ARD หรือไม่ พบว่า กรณีที่ cytoplasmic pattern เป็นบวก มีสัดส่วนการพบแอนติบอดีจำเพาะร้อยละ 61.9 (13/21) และเป็นผู้ป่วย ARD ร้อยละ 71.4 (15/21) ขณะที่หากตรวจไม่พบ cytoplasmic pattern มีสัดส่วนการพบแอนติบอดีจำเพาะร้อยละ 14.2 (15/106) และเป็นผู้ป่วย ARD ร้อยละ 32.1 (34/106) ซึ่งพบว่า cytoplasmic pattern ที่เป็นบวกและลบให้ผลการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ และการวินิจฉัยว่าเป็นผู้ป่วย ARD แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$ และ $p = 0.001$ ตามลำดับ) (Table 2)

ส่วน mitotic pattern ที่ให้ผลเป็นบวก มีสัดส่วนการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะร้อยละ 12.5 (1/8) และเป็นผู้ป่วย ARD ร้อยละ 50.0 (4/8) ขณะที่กลุ่มที่ตรวจไม่พบ mitotic pattern มีสัดส่วนการพบแอนติบอดีจำเพาะร้อยละ 22.7 (27/119) และเป็นผู้ป่วย ARD ร้อยละ 37.8 (45/119) ซึ่งพบว่า mitotic pattern ที่เป็นบวกและลบให้ผลการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ และการวินิจฉัยว่าเป็นผู้ป่วย ARD ไม่แตกต่างกัน ($p = 0.684$ และ $p = 0.710$ ตามลำดับ) (Table 2) และเนื่องจากจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่มีผล mitotic pattern เป็นบวกที่มีเพียง 8 ราย จึงไม่นำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2. การตรวจวิเคราะห์ ANA ร่วมกับการตรวจ Specific Antibody

ผู้ป่วยที่มีผลตรวจ ANA ที่มี cytoplasmic pattern เป็นบวก เมื่อตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะร่วม

ด้วย มีสัดส่วนในการวินิจฉัยว่าเป็น ARD ร้อยละ 92.3 (12/13) ขณะที่กลุ่มที่ไม่พบแอนติบอดีจำเพาะ มีสัดส่วนในการวินิจฉัยว่าเป็นผู้ป่วย ARD ร้อยละ 37.5 (3/8) ส่วนกลุ่มที่มี cytoplasmic pattern เป็นลบ ผลการตรวจแอนติบอดีจำเพาะที่เป็นบวกและลบ มีสัดส่วนการวินิจฉัยว่าเป็นผู้ป่วย ARD ร้อยละ 33.3 (5/15) และร้อยละ 31.9 (29/91) ตามลำดับ (Table 3)

ในกรณีการวินิจฉัยโรค SLE พบว่า กลุ่มที่มีสัดส่วนการเป็นผู้ป่วย SLE สูงที่สุดคือกลุ่มที่มีผล cytoplasmic pattern เป็นบวกและตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะร่วมด้วย โดยเป็นผู้ป่วย SLE ร้อยละ 30.8 (4/13) แต่เนื่องจากจำนวนที่ตรวจพบยังน้อยเกินไปจึงไม่อาจสรุปผลในทางสถิติได้ (Table 3)

3. Specific Antibody ที่ตรวจพบ

การตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะแต่ละชนิดในตัวอย่างซีรัมที่มีผล ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส จำแนกตามผลการวินิจฉัยว่าเป็นกลุ่มโรค ARD หรือไม่ และตามการตรวจพบ cytoplasmic pattern พบว่า กลุ่ม ARD ที่มี cytoplasmic pattern เป็นบวก สามารถตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะได้มากที่สุด โดยในกลุ่มนี้ พบ anti-Ro52 ในผู้ป่วยร้อยละ 73.3 (11/15), พบ anti-SSA ร้อยละ 40.0 (6/15) ซึ่งเป็นการพบร่วมกับ anti-Ro52 ทั้งหมด โดยพบ anti-Jo1 ร้อยละ 20.0 (3/15) anti-RIB-P ร้อยละ 13.3 (2/15) และ anti-nRNP/Sm ร้อยละ 6.7 (1/15) ตามลำดับ โดยมีความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกตั้งแต่ระดับ borderline ถึง 3+ และส่วนใหญ่พบที่ 3+ รองลงมาคือกลุ่ม ARD ที่มี cytoplasmic pattern เป็นลบ โดยพบแอนติบอดีจำเพาะ ที่มีความเข้มระดับต่ำถึงปานกลาง ส่วนใหญ่อยู่ที่ 2+ สำหรับกลุ่ม non-ARD ที่มี cytoplasmic pattern เป็นลบ สามารถตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะได้บ้าง โดยส่วนใหญ่มีระดับความเข้มต่ำ คือ

borderline ถึง 1+ นอกจากนี้ พบว่ามีผู้ป่วย non-ARD ที่ตรวจพบ cytoplasmic pattern และมี anti-dsDNA ที่มีระดับความเข้ม 1+ จำนวน 1 ราย (Table 4)

4. โรคที่พบจากการวินิจฉัย

จากกลุ่มผู้ป่วยที่มีผล ANA เป็นลบ 127 ราย ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกลุ่ม ARD 49 ราย โรคที่พบมากที่สุดคือ SLE ซึ่งพบทั้งหมด 15 ราย (ร้อยละ 30.6) (Table 5) โดยเป็น SLE ที่ตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ 6 ราย (ในจำนวนนี้ตรวจพบ cytoplasmic pattern ร่วมด้วย 4 ราย) และตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเอง 9 ราย (Table 3) และกลุ่ม ARD ชนิดอื่นที่มี cytoplasmic pattern เป็นบวก และมีแอนติบอดีจำเพาะร่วมด้วย ได้แก่ antisynthetase syndrome, dermatomyositis, early systemic sclerosis with MCTD, necrotizing autoimmune myositis, subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE), undifferentiated connective tissue disease with nonspecific interstitial pneumonia และ interstitial lung disease with fibrosis (Table 5)

ในกลุ่มผู้ป่วย ARD 49 รายนี้ มีทั้งหมด 17 รายที่ตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะซึ่งได้แจกแจงรายละเอียดของผลการตรวจและการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วยแต่ละราย ดังแสดงใน Table 6

สำหรับผู้ป่วยกลุ่ม non-ARD 78 ราย ตรวจพบ cytoplasmic pattern 6 ราย ในจำนวนนี้ตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะเพียง 1 ราย ซึ่งเป็นโรค parotid gland tumor ที่เหลืออีก 5 ราย เป็นโรคอื่นๆ ส่วนผู้ป่วย non-ARD อีก 72 รายที่ตรวจไม่พบ cytoplasmic pattern มี 10 รายที่ตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ (ส่วนใหญ่มีความเข้มในระดับ borderline ถึง 1+ ดังแสดงใน Table 4 โดยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยโรคไต ได้แก่ nephrotic syndrome, chronic kidney

disease, acute renal failure with tubular necrosis/acute tubular necrosis และ renal artery thrombosis และพบใน non-ARD ชนิดอื่น ได้แก่

pulmonary tuberculosis, interstitial pneumonia/ interstitial pulmonary disease และ cavernous sinus thrombosis (Table 5)

Table 1 Proportion of ANA pattern in serum of patients suspected of autoimmune rheumatic diseases

ANA by IFA	Proportion; %
Positive ANA nuclear pattern	875/1,002 ; 87.3%
Negative ANA nuclear pattern	127/1,002 ; 12.7%

Table 2 Proportion of subsequent specific antibody detection and diagnosis as ARD for cases of negative ANA nuclear pattern

Cytoplasmic/mitotic patterns		Specific antibody detection		ARD	
		Proportion ; %	p-value	Proportion ; %	p-value
Cytoplasmic	Positive 21/127 ; 16.5%	13/21 ; 61.9%	<0.001 ^f	15/21 ; 71.4%	0.001*
	Negative 106/127 ; 83.5%	15/106 ; 14.2%		34/106 ; 32.1%	
Mitotic	Positive 8/127 ; 6.3%	1/8 ; 12.5%	0.684 ^f	4/8 ; 50.0%	0.710 ^f
	Negative 119/127 ; 93.7%	27/119 ; 22.7%		45/119 ; 37.8%	

ARD = autoimmune rheumatic disease

*chi-square test

^f Fisher's exact test

Table 3 Classification of patients with negative ANA nuclear pattern, with proportion, based on cytoplasmic patterns and specific antibody detection

Cytoplasmic patterns			Specific antibody		Diagnosis		SLE/Non-SLE	
Pos	21/127	16.5%	Pos	13/21	61.9%	ARD	12/13	92.3%
						Non-ARD	1/13	7.7%
			Neg	8/21	38.1%	ARD	3/8	37.5%
						Non-ARD	5/8	62.5%
Neg	106/127	83.5%	Pos	15/106	14.2%	ARD	5/15	33.3%
						Non-ARD	10/15	66.7%
			Neg	91/106	85.8%	ARD	29/91	31.9%
						Non-ARD	62/91	68.1%

Table 4 Proportion of specific antibodies detected in patients with negative ANA nuclear pattern, classified by cytoplasmic pattern detection and ARD diagnosis

Patients	Specific antibody	Nuclear pattern of ANA by IFA negative					
		Cytoplasmic patterns negative (N = 106)			Cytoplasmic patterns positive (N = 21)		
		N of Cases	Frequency; %	Specific Ab intensity	N of Cases	Frequency; %	Specific Ab intensity (& most frequent)
ARD	anti-nRNP/Sm	34	1; 2.9%	1+	15	1; 6.7%	borderline
	anti-Sm		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-SSA		1; 2.9%	borderline		6; 40.0%	borderline to 3+ (3+)
	anti-SSA and Ro52		0; 0.0%			6; 40.0%	borderline to 3+ (3+)
	anti-Ro52		2; 5.9%	2+		11; 73.3%	borderline to 3+ (3+)
	anti-SSB		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-Scl70		1; 2.9%	2+		0; 0.0%	
	anti-Centromere B		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-dsDNA		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-Nucleosomes		1; 2.9%	2+		0; 0.0%	
	anti-Histones		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-Jo1		0; 0.0%			3; 20.0%	3+
	anti-RIB-P		0; 0.0%			2; 13.3%	1+
Non-ARD	anti-nRNP/Sm	72	2; 2.8%	borderline to 1+	6	0; 0.0%	
	anti-Sm		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-SSA		3; 4.2%	borderline to 2+		0; 0.0%	
	anti-SSA and Ro52		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-Ro52		2; 2.8%	borderline to 1+		0; 0.0%	
	anti-SSB		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-Scl70		1; 1.4%	borderline		0; 0.0%	
	anti-Centromere B		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-dsDNA		0; 0.0%			1; 16.7%	1+
	anti-Nucleosomes		0; 0.0%			0; 0.0%	
	anti-Histones		2; 2.8%	1+		0; 0.0%	
	anti-Jo1		2; 2.8%	borderline to 1+		0; 0.0%	
	anti-RIB-P		0; 0.0%			0; 0.0%	

Table 5 Clinical diagnosis of patients suspected of autoimmune rheumatic diseases with negative ANA nuclear pattern

Group	Diseases	Frequency	Cases with specific antibody detected								
			nRNP/Sm	SSA	Ro52	SCI70	dsDNA	Nucleosomes	Histones	Jo1	RIBP
ARD N = 49	SLE (**3 cases)	12;	1	2	4	1	-	-	-	-	2
	SLE+ dermatomyositis+ antisynthetase syndrome**	1;	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	SLE+ rheumatoid arthritis	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SLE+ Behcet's disease	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rheumatoid arthritis	5;	1*	1*	-	-	-	-	-	-	-
	Cutaneous vasculitis	4;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Undifferentiated arthritis	3;	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	Antisynthetase syndrome**	2;	-	-	2*	-	-	-	-	2*	-
	Dermatomyositis**	1;	-	1*	1*	-	-	-	-	-	-
	Early systemic sclerosis (SSC) with Mixed connective tissue disease (MCTD)**	1;	-	1*	1*	-	-	-	-	-	-
	Necrotizing autoimmune myositis**	1;	-	1*	1*	-	-	-	-	-	-
	Subacute cutaneous LE (SCLE)**	1;	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	Undifferentiated connective tissue disease with nonspecific interstitial pneumonia**	1;	-	1*	1*	-	-	-	-	-	-
	Interstitial lung disease (ILD) with fibrosis**	1;	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	Polyarteritis nodosa (PAN)	2;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Behcet's disease	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Polyarticular juvenile idiopathic arthritis	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Autoinflammatory disease	1;	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	Medium vessel vasculitis, unspecified	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ANCA associated vasculitis	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Microscopic polyangiitis	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neonatal Autoimmune Thrombocytopenia	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lupus nephritis class 5 (Glomerular disorders in systemic connective tissue disorders)	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Discoid lupus erythematosus (DLE)	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sclerodactyly with dilated cardiomyopathy	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Idiopathic cavernous sinus syndrome	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Autoimmune hemolytic anemia	1;	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ARD: autoimmune rheumatic disease, non-ARD: diseases other than ARD, (-): Negative

*specific antibodies are detected in the same case(s), **positive ANA cytoplasmic pattern

Table 5 Clinical diagnosis of patients suspected of autoimmune rheumatic diseases with negative ANA nuclear pattern (Cont.)

Group	Diseases	Frequency	Cases with specific antibody detected								
			nRNP/Sm	SSA	Ro52	SCI70	dsDNA	Nucleosomes	Histones	Jo1	RBP
non-ARD N = 78	Nephrotic syndrome	10;	-	1	1	-	-	-	-	-	-
	Chronic kidney disease	5;	-	-	-	-	-	-	1*	1*	-
	Acute renal failure with tubular necrosis/ Acute tubular necrosis	4;	1*	1*	-	1	-	-	-	-	-
	Renal artery thrombosis	1;	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	Acute post-streptococcal glomerulonephritis	5;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rapid progressive glomerulonephritis	2;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflammatory polyarthropathies	3;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflammatory polyneuropathy	3;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pulmonary Tuberculosis	2;	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	Multiple sclerosis	2;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Erythema nodosum	2;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chronic urticaria	2;	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Interstitial pneumonia/Interstitial pulmonary disease	2;	-	-	1	-	-	-	1	-	-
	Cavernous sinus thrombosis	1;	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Parotid gland tumor**	1;	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	Others; Infectious diseases, neoplasm, anaphylaxis, arthropathies, Rhabdomyolysis and disease of; nervous system, circulatory system, skin and subcutaneous tissue (**5 cases)	33;	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ARD: autoimmune rheumatic disease, non-ARD: diseases other than ARD, (-): Negative

*specific antibodies are detected in the same case(s), **positive ANA cytoplasmic pattern

Table 6 Specific antibodies detected in autoimmune rheumatic disease patients with negative ANA nuclear pattern

ANA patterns other than nuclear		Specific antibodies by LIA	Diagnosis	Frequency
Cytoplasmic pattern	Mitotic pattern			
Homogeneous 4+	Negative	anti-Ro52 (borderline)	SLE	1 (No.33)
Fine speckle 2+	Negative	anti-SSA (2+) anti-Ro52 (3+) anti-RIB-P 1+	SLE	1 (No.105)
Negative	Negative	Anti-Scl70 (2+)	SLE, CNS vasculitis, antiphospholipid syndrome	1 (No.34)
Negative	Negative	Anti-Ro52 (2+)	SLE, Autoimmune hepatitis	1 (No.65)
Fine speckle 1+	Negative	Anti-Jo1 (3+)	Dermatomyositis with anti- synthetase syndrome, SLE	1 (No.103)
Fine speckle 3+	Negative	anti-nRNP/Sm (Borderline) anti-SSA = 3+ anti-Ro52 = 3+ anti-RIB-P = 1+	SLE with lupus nephritis	1 (No.104)
Anti-golgi-apparatus (4+)	Negative	Anti-SSA (3+) Anti-Ro52 (3+)	Early systemic sclerosis, MCTD	1 (No.48)
Coarse speckle 4+	Negative	Anti-SSA 3+ anti-Ro52 (borderline)	Dermatomyositis	1 (No.127)
Coarse speckle 3+	Negative	Anti-Ro52 (1+)	Subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE)	1 (No.126)
Negative	Negative	anti-nucleosomes (2+)	Undifferentiated arthritis	1 (No.32)
Negative	anti-Centrioles (3+)	anti-Ro52 (2+)	Autoinflammatory disease	1 (No.49)
Negative	Negative	anti-nRNP/Sm 1+ anti-SSA (borderline)	Rheumatoid arthritis	1 (No.102)
Coarse speckle 3+	Negative	Anti-Ro52 (borderline) Anti-Jo1 (3+)	Antisynthetase syndrome	1 (No.47)
Fine speckle 2+	Negative	Anti-Ro52 (3+) anti-Jo1 (3+)	Antisynthetase syndrome	1 (No.125)
Homogeneous 4+	Negative	Anti-SSA (borderline) Anti-Ro52 (1+)	Necrotizing autoimmune myositis	1 (No.62)
Homogeneous 3+	Negative	anti-Ro52 (3+)	Interstitial lung disease with fibrosis	1 (No.40)
Homogeneous 2+	Negative	anti-SSA = 1+ anti-Ro52 = 3+	Undifferentiated connective tissue disease with nonspecific interstitial pneumonia	1 (No.106)

วิจารณ์

จากการศึกษาตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยภาวะภูมิคุ้มกันต้านเนื้อเยื่อตนเองและส่งตรวจ ANA และ anti-ENA โดยสืบค้นข้อมูลย้อนหลังจากทะเบียนบันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และศึกษาผลการวินิจฉัยโรคจากเวชระเบียนของผู้ป่วยเฉพาะรายที่มีผล ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส 127 ราย พบว่า ผู้ป่วยที่มี cytoplasmic pattern เป็นบวก มีสัดส่วนการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะและเป็นผู้ป่วย ARD ที่ค่อนข้างสูง ผลการศึกษาที่ได้เป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Koh และคณะ ที่ได้แนะนำว่าการตรวจพบ cytoplasmic pattern อาจช่วยบ่งชี้การมี anti-ENA ในกรณีที่ nuclear pattern เป็นลบได้⁽¹⁸⁾ สำหรับ mitotic pattern มีรายงานความเกี่ยวข้องกับ CTD บางชนิด โดยเฉพาะ Sjögren's syndrome, rheumatoid arthritis และ SLE เป็นต้น^(19, 20) ซึ่งผู้ป่วย SLE ที่มี ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส สามารถตรวจพบ mitotic pattern ได้ในอัตราที่ค่อนข้างต่ำ⁽²¹⁾ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาี้พบว่า ผลบวกและผลลบของ mitotic pattern ไม่ให้ความแตกต่างในการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะและการวินิจฉัยว่าเป็นผู้ป่วย ARD แต่เนื่องจากผู้ป่วยที่มีผล mitotic pattern เป็นบวกมีจำนวนน้อยทำให้ค่าสัดส่วนของสิ่งที่ต้องการศึกษามีการวัดที่หยาบ จึงอาจไม่ใช่ตัวแทนที่ดี

จากการศึกษาในอดีตพบว่า การวินิจฉัยผู้ป่วยที่เป็น ARD นั้น การตรวจพบ ANA ร่วมกับแอนติบอดีจำเพาะจะช่วยเพิ่มความจำเพาะในการวินิจฉัยกลุ่มโรค systemic rheumatic diseases ได้สูงขึ้น⁽²²⁾ สำหรับการวิจัยนี้ได้มุ่งศึกษาในกรณีที่ผู้ป่วยมีผลการตรวจคัดกรอง ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส และดูผลของการตรวจพบ cytoplasmic และ mitotic pattern โดยพบว่ากรณีที่ตรวจพบ

cytoplasmic pattern ร่วมกับมีแอนติบอดีจำเพาะเป็นบวก จะมีสัดส่วนการเป็นผู้ป่วย ARD ที่สูงขึ้นมากกว่าจากการตรวจเฉพาะ ANA screening test เพียงอย่างเดียว คือจากร้อยละ 71.4 (15/21) เป็นร้อยละ 92.3 (12/13) ในทางกลับกัน กรณีที่ไม่พบ cytoplasmic pattern การตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะไม่ได้ช่วยจำแนกผู้ป่วย ARD ให้ชัดเจนขึ้นเนื่องจากสัดส่วนของผู้ป่วย ARD ในกลุ่มที่พบและไม่พบแอนติบอดีจำเพาะมีค่าใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 33.3 (5/15) ในกลุ่มที่พบ และร้อยละ 31.9 (29/91) ในกลุ่มที่ไม่พบ และไม่ต่างจากการตรวจ ANA screening test เพียงอย่างเดียวมากนัก คือร้อยละ 32.1 (34/106) ซึ่งข้อสังเกตนี้ น่าจะมีส่วนช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยที่มีผล ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส แต่มีอาการทางคลินิกที่สงสัยกลุ่มโรค ARD ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ส่วนผลของการตรวจพบ mitotic pattern นั้น กลุ่มตัวอย่างมีขนาดเล็กจนไม่สามารถวิเคราะห์ทางสถิติได้

แนวปฏิบัติในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเอง ได้แนะนำให้ตรวจแอนติบอดีจำเพาะในผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกของกลุ่มโรค ARD ชัดเจนแม้จะมีผลตรวจ ANA เป็นลบ⁽⁸⁾ นอกจากนี้ Hoffman และคณะ ได้แนะนำให้ตรวจ anti-ENA ในผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกที่สงสัยโรค rheumatic connective tissue disease ที่มีผลตรวจ ANA เป็นลบด้วย เพื่อไม่ให้พลาดโอกาสในการตรวจพบ anti-SSA/Ro, anti-SSB และ anti-Jo1 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยโรคบางชนิด⁽¹⁰⁾ และจากรายงานของ Gonzalez และคณะ ที่ได้ศึกษาในผู้ป่วยที่มีผลตรวจ ANA เป็นบวก พบว่า นอกจากการติดสีในนิวเคลียสรูปแบบ nuclear speckled pattern ซึ่งพบได้เป็นส่วนใหญ่ในการตรวจพบ anti-Ro52 และ anti-Ro60 แล้ว ในผู้ป่วยที่มี cytoplasmic pattern เป็นบวก

ก็สามารถพบแอนติบอดีจำเพาะดังกล่าวได้จำนวนมาก โดยเฉพาะการตรวจพบ anti-Ro52 เพียงชนิดเดียว⁽²³⁾ สำหรับการศึกษาที่พบว่า ในผู้ป่วยที่มี ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส anti-ENA ที่พบมากที่สุด ได้แก่ anti-Ro52, anti-SSA และ anti-Jo1 ตามลำดับ โดยไม่มี anti-SSB (La) ร่วมด้วย ซึ่งการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ ดังกล่าวมีอัตราสูงในกรณีที่ cytoplasmic pattern เป็นบวกและผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น ARD ทั้งนี้ อาจอธิบายได้จากรายงานการศึกษาที่พบว่า Ro52, Ro60 และ SSB (La) เป็นส่วนประกอบของ Ro ribonucleoprotein (RNP) complex ซึ่งมีอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์เป็นหลัก⁽²⁴⁾ โดย Ro52 เป็นโปรตีนขนาด 52 kDa ที่สามารถพบได้ทั้งในนิวเคลียส และพบได้เป็นจำนวนมากในไซโทพลาสซึมของเซลล์^(25, 26) ส่วน Ro60 ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 60 kDa ที่ยึดเกาะกับ Y-RNA ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยตรง (Ro60/Y-RNA complex) เพื่อประกอบเป็น RNP complex มีอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์เป็นส่วนใหญ่ด้วยเช่นกัน⁽²⁷⁾ ซึ่ง SSB (La) และ Ro60/Y-RNA complex ที่เกิดขึ้นในนิวเคลียสจะถูกส่งออกมาอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์⁽²⁸⁾ ทำให้แม้ ANA ให้ผลเป็นลบในส่วนของนิวเคลียส การตรวจพบ cytoplasmic pattern ก็ยังมีความเชื่อมโยงกับการตรวจพบ anti-Ro52 และ anti-Ro60 ได้ในอัตราที่ค่อนข้างสูง

สำหรับ cytoplasmic pattern ที่มีความเกี่ยวข้องกับแอนติบอดีต่อแอนติเจนในไซโทพลาสซึม โดยมีความเชื่อมโยงกับการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะบางชนิด เช่น แอนติบอดีต่อเอนไซม์ histidyl-tRNA-synthetase (Jo1) ซึ่งมีอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์เป็นส่วนใหญ่⁽²⁵⁾ ได้แก่ รูปแบบ cytoplasmic fine speckled หรือ cytoplasmic speckled โดยมีการศึกษาที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับ myositis-specific autoantibody (MSA) อีกหลายๆ ชนิด

ซึ่งพบได้บ่อยและเกี่ยวข้องกับโรค polymyositis, dermatomyositis และกลุ่มอาการ antisynthetase syndrome เป็นต้น⁽²⁹⁻³²⁾ และในการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วย antisynthetase syndrome ที่ตรวจพบ MSA ชนิด anti-Jo1 มีผลการตรวจคัดกรอง ANA ที่พบ cytoplasmic fine speckled หรือ cytoplasmic coarse speckled ร่วมด้วย ซึ่ง Aggarwal และคณะ ได้เคยรายงานว่าการตรวจพบ cytoplasmic pattern ร่วมกับ anti-Jo1 จะช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัย antisynthetase syndrome ได้สูงขึ้น⁽³³⁾ และในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับ idiopathic inflammatory myopathies (IIM) หรือสงสัย connective tissue disease ที่มี ANA รูปแบบ cytoplasmic speckled สามารถตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะต่อ synthetase profile ได้สูงด้วย และหนึ่งในนั้นก็คือ anti-Jo1 โดยมีความเข้มของปฏิกิริยาการให้ผลบวกในการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะที่สูงด้วย⁽³⁴⁾ ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วย antisynthetase syndrome ที่มี ANA ติดสีในไซโทพลาสซึมรูปแบบ cytoplasmic speckled มีความเข้มของ anti-Jo1 สูงด้วยเช่นกัน ในขณะที่ในกลุ่ม non-ARD ส่วนใหญ่ที่มีผลการตรวจคัดกรอง ANA เป็นลบโดยไม่ติดสีในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม กรณีที่ตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะจะมีความเข้มที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยโรคไตและโรคติดเชื้อ เป็นต้น

นอกจากนี้ เราพบว่าผู้ป่วย antisynthetase syndrome ที่มี ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส ที่มี cytoplasmic speckled pattern 2 ใน 3 ราย ตรวจพบ anti-Jo1 ร่วมกับ anti-Ro52 โดยก่อนหน้านี้มีผู้พบว่า anti-Ro52 สามารถพบได้ในอัตราสูงในผู้ป่วย myositis⁽³⁵⁾ และ antisynthetase syndrome⁽³⁰⁾ และ Infantino และคณะ ได้รายงานการตรวจพบ anti-Ro52 ซึ่งเป็น myositis associ-

ated autoantibody ที่พบมากที่สุดและผู้ป่วย IIM ซึ่งมักพบร่วมกับ anti-Jo1 โดยในการตรวจคัดกรอง ANA สามารถพบได้ทั้งในกรณีที่มี ANA เป็นบวก รูปแบบ nuclear speckled หรือตรวจพบเฉพาะ cytoplasmic pattern รวมทั้งกลุ่มที่ ANA เป็นลบทั้งหมด และได้แนะนำให้ตรวจ MSA ชนิดอื่นสำหรับผู้ป่วยที่มีอาการสงสัย IIM ที่มีผลการตรวจ ANA, anti-Ro52 และ anti-Jo1 เป็นลบ⁽³⁶⁾ ซึ่งกรณีการตรวจพบ anti-Jo1 และ anti-Ro52 ร่วมกันนี้ ผู้ป่วยมักจะมีอาการของโรคกล้ามเนื้ออักเสบที่รุนแรง มีความบกพร่องของข้อต่อ โดยมักพบ interstitial lung disease (ILD) ร่วมด้วย และมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง⁽³⁷⁾

จากการศึกษาของ Friedman และคณะ ซึ่งได้รายงานกรณีของผู้ป่วย ILD ที่มี cytoplasmic pattern เป็นบวก พบว่าอาจมี antisynthetase syndrome ได้แม้จะยังไม่มีอาการทางคลินิกของ myositis และได้แนะนำให้ตรวจหา anti-aminoacyl-tRNA synthetase ในผู้ป่วย ILD ที่ตรวจพบ cytoplasmic pattern ร่วมด้วย⁽³⁸⁾ ต่อมา Shao และคณะ รายงานกรณีที่ผู้ป่วย ILD มี cytoplasmic pattern เป็นบวก และมี anti-Ro52 จะตรวจพบ anti-aminoacyl-tRNA synthetase ได้ในอัตราที่สูง⁽³⁹⁾ ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วย ILD ที่มี ANA รูปแบบ cytoplasmic homogeneous และตรวจพบ anti-Ro52 แต่ไม่พบ anti-Jo1 ซึ่งเป็นหนึ่งใน anti-synthetase antibody อย่างไรก็ตาม แม้จะพบผู้ป่วยกรณีดังกล่าวได้ไม่บ่อย หากการตรวจคัดกรอง ANA ด้วยวิธี IFA ให้ผลเป็นลบในส่วนของนิวเคลียส แต่พบ cytoplasmic pattern ร่วมกับมี anti-Ro52 ในผู้ป่วย ILD ควรมีการติดตามตรวจหา anti-aminoacyl-tRNA synthetase ซึ่งชนิดที่นิยมใช้อยู่ทั่วไปในงานตรวจทางห้องปฏิบัติการประจำวัน ได้แก่ anti-Jo1 เพื่อประกอบการวินิจฉัยกลุ่มโรค idio-

pathic inflammatory myopathies ต่อไป

นอกจากนี้ cytoplasmic pattern ที่พบได้บ่อยในงานตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและมีความเกี่ยวข้องกับ anti-RIB-P ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ribosomal protein ที่ส่วนใหญ่อยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ คือ รูปแบบ cytoplasmic dense fine speckled (homogeneous) โดยพบได้ใน ARD หลายๆ โรค เช่น SLE, antisynthetase syndrome และ ILD⁽⁴⁰⁾ โดยในผู้ป่วย SLE สามารถตรวจพบ anti-RIB-P ได้ในอัตราที่สูง และเป็นหนึ่งในแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโรค SLE สูงด้วยเช่นกัน⁽⁴¹⁾ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีอาการทางจิตเวชและระบบประสาท (neuropsychiatric SLE)^(42, 43) lupus nephritis, lupus hepatitis⁽⁴³⁾ และ skin erythema⁽⁴¹⁾ และมักพบในผู้ป่วย SLE ที่มีอายุค่อนข้างน้อย^(41, 43, 44) จากการศึกษาของ Mahler และคณะ พบว่า การตรวจ ANA ด้วยวิธี IFA มีความไวค่อนข้างต่ำสำหรับการตรวจพบ anti-RIB-P โดยจะพบ cytoplasmic pattern ได้สูงเฉพาะในกรณีที่ผู้ป่วยมี anti-RIB-P ที่มีไตเตอร์ปานกลางและสูง⁽⁴⁵⁾ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาที่พบว่าผู้ป่วย SLE ที่เป็น lupus nephritis ซึ่งมีผลการตรวจ ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส และตรวจพบ anti-RIB-P ที่มีความเข้มค่อนข้างต่ำ (1+) แต่กลับมีการติดสีในไซโทพลาสซึมรูปแบบ cytoplasmic fine speckled ที่มีความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ค่อนข้างสูง (3+) ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากการตรวจพบ anti-SSA และ anti-Ro52 ที่มีความเข้มสูงร่วมด้วย

cytoplasmic pattern ที่ตรวจพบได้ไม่บ่อย เช่น anti-golgi apparatus เราพบว่ามีความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ที่สูงในผู้ป่วย early systemic sclerosis ที่มี MCTD ร่วมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ma และคณะ ที่ตรวจพบ anti-golgi apparatus ที่มีไตเตอร์สูงอย่างต่อเนื่อง

ในผู้ป่วย ARD⁽⁴⁶⁾ แต่ก็สามารถพบได้ในโรคชนิดอื่นที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับโรค ARD โดยเฉพาะกลุ่มที่ไม่ใช่ systemic autoimmune disease ด้วยเช่นกัน^(32, 46)

ในการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่มี ANA เป็นลบ แต่สามารถตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะได้ในความเข้มต่ำๆ และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น non-ARD แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะพัฒนาโรคไปเป็น ARD ในอนาคต เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเองหลายชนิดได้เป็นเวลาหลายปีก่อนที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการและได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค SLE⁽⁴⁷⁾ ดังนั้นอาจจะต้องให้ความสำคัญกับการตรวจพบแอนติบอดีต่อเซลล์ตนเองในผู้ป่วยกลุ่มนี้ต่อไป

สรุป

เมื่อ ANA ให้ผลเป็นลบโดยไม่ติดสีในนิวเคลียส การติดสีของ cytoplasmic pattern น่าจะมีความสามารถในการช่วยคัดกรองว่าการส่งตรวจแอนติบอดีจำเพาะจะมีแนวโน้มที่จะแยกผู้ป่วย ARD กับ non-ARD ได้ชัดเจนขึ้นหรือไม่ โดยหากพบการติดสีของ cytoplasmic pattern การตรวจแอนติบอดีจำเพาะจะช่วยแยกกลุ่มผู้ป่วย ARD ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น แต่หากไม่พบ cytoplasmic pattern การตรวจแอนติบอดีจำเพาะอาจไม่ช่วยแยกกลุ่มผู้ป่วย ARD ได้ แม้จะใช้ระดับความเข้มของแอนติบอดีจำเพาะช่วยบอกแนวโน้มของ ARD ได้บ้างถ้าตรวจพบ

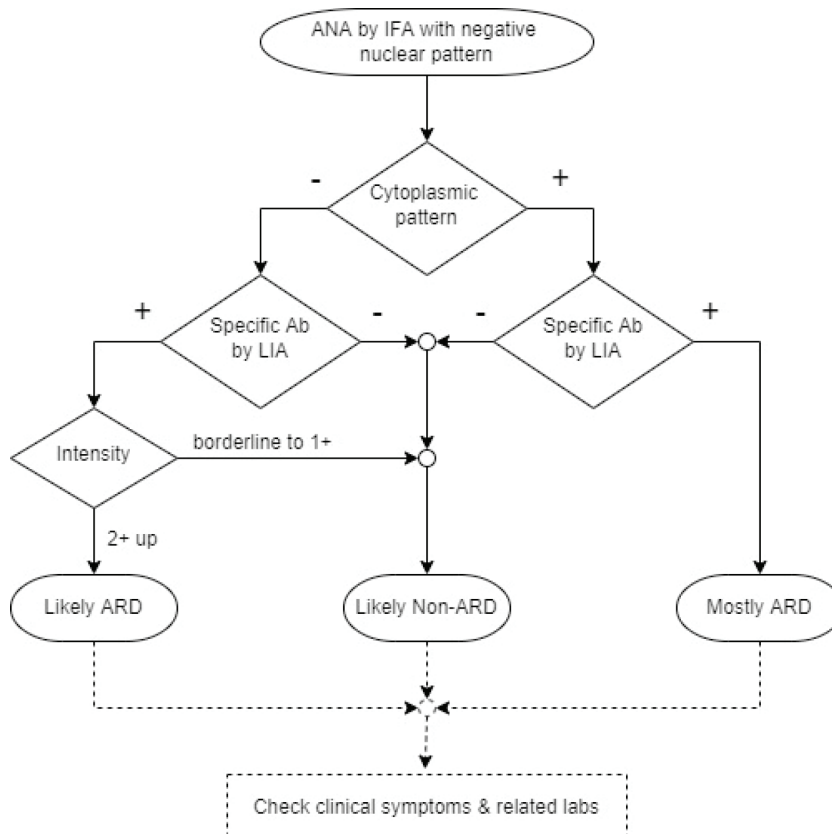


Fig. 1 Suggested flow for diagnosing cases of negative ANA nuclear patterns by IFA. ANA: antinuclear antibody, ARD: autoimmune rheumatic disease, IFA: indirect immunofluorescence assay, LIA: line immunoblot assay

ข้อสรุปดังกล่าวจึงเสนอเป็นแนวทางการวินิจฉัยโรค ARD เบื้องต้นสำหรับกลุ่มที่มีผล ANA เป็นลบในส่วนของนิวเคลียส ดังแสดงใน Fig. 1 คือ ถ้าพบ cytoplasmic pattern ควรส่งตรวจแอนติบอดีจำเพาะ โดยถ้าได้ผลเป็นบวกจะค่อนข้างมั่นใจได้ว่าจะเป็นกลุ่มโรค ARD แต่ถ้าผลเป็นลบก็มีแนวโน้มว่าจะไม่ใช่กลุ่มโรค ARD ส่วนในกรณีที่พบ cytoplasmic pattern ก็อาจส่งตรวจแอนติบอดีจำเพาะเพื่อประกอบการวินิจฉัยได้ โดยหากตรวจพบและมีความเข้มข้นในระดับ 2+ ขึ้นไป ก็มีแนวโน้มจะเป็นกลุ่มโรค ARD แต่หากตรวจไม่พบหรือพบในระดับความเข้ม 1+ ลงมา ก็มีแนวโน้มที่จะไม่ใช่กลุ่มโรค ARD ทั้งนี้ แนวโน้มต่างๆ ที่ได้จากแนวทางการตรวจนี้ บ่งบอกเพียงโอกาสความเป็นไปได้เท่านั้น ยังต้องพิจารณาร่วมกับอาการทางคลินิกและการตรวจทางห้องปฏิบัติการชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2563 จากสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อ.ดร. อธิศักดิ์ พาจันทร์ วิทยากรชำนาญการพิเศษ วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร ผู้ให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และขอขอบคุณบุคลากรศูนย์วิจัย และบุคลากรงานเวชระเบียน โรงพยาบาลขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการสืบค้นข้อมูลในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 2009; 4: 1.
2. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1420-2.
3. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, *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.
4. Damoiseaux J, von Mühlén CA, Garcia-De La Torre I, *et al.* International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto-Immun Highlights* 2016; 7: 1.
5. Chan EKL, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, *et al.* Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus* 2016; 25: 797-804.
6. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, *et al.* International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as antinuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 17-23.

7. Murakami K, Mimori T. Recent Advances in Research Regarding Autoantibodies in Connective Tissue Diseases and Related Disorders. *Intern Med Tokyo Jpn* 2019; 58: 5-14.
8. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, *et al.* Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 316-24.
9. Pollock W, Toh BH. Routine immunofluorescence detection of Ro/SS-A autoantibody using HEp-2 cells transfected with human 60 kDa Ro/SS-A. *J Clin Pathol* 1999; 52: 684-7.
10. Hoffman IEA, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clin Chem* 2002; 48: 2171-6.
11. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, *et al.* 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2019; 71: 1400-12.
12. Maraina CHC, Kamaliah MD, Ishak M. ANA negative (Ro) lupus erythematosus with multiple major organ involvement: a case report. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2002; 20: 279-82.
13. Sugisaki K, Takeda I, Kanno T, *et al.* An anti-nuclear antibody-negative patient with systemic lupus erythematosus (SLE) accompanied with anti-ribosomal P antibody (anti-P). *Intern Med Tokyo Jpn* 2002; 41: 1047-51.
14. Song L-J, Ding F, Liu H-X, *et al.* Analysis of 15 patients with systemic lupus erythematosus manifesting with negative immunofluorescence anti-nuclear antibodies after treatment. *Lupus* 2012; 21: 919-24.
15. Caltik A, Demircin G, Bulbul M, Erdogan O, Akyuz SG, Arda N. An unusual case of ANA negative systemic lupus erythematosus presented with vasculitis, long-standing serositis and full-house nephropathy. *Rheumatol Int* 2013; 33: 219-22.
16. Simmons SC, Smith ML, Chang-Miller A, Keddis MT. Antinuclear Antibody-Negative Lupus Nephritis with Full House Nephropathy: A Case Report and Review of the Literature. *Am J Nephrol* 2015; 42: 451-9.
17. Chander R, Singh S, Kalantri SA, Charan S, Gupta A. Sero-Negative Systemic Sclerosis: A Rare Presentation. *J Clin Diagn Res JCDR* 2016; 10: OD12-13.
18. Koh WH, Dunphy J, Whyte J, Dixey J, McHugh NJ. Characterisation of anticytoplasmic antibodies and their clinical associations. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 269-73.

19. Xi Q, Wu Y, Li L, *et al.* Anti-Mitotic Spindle Apparatus Autoantibodies: Prevalence and Disease Association in Chinese Population. *J Clin Lab Anal* 2016; 30: 702-8.
20. Betancur JF, Londoño A, Estrada VE, *et al.* Uncommon patterns of antinuclear antibodies recognizing mitotic spindle apparatus antigens and clinical associations. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: e11727.
21. Choi MY, Clarke AE, St Pierre Y, *et al.* Antinuclear Antibody-Negative Systemic Lupus Erythematosus in an International Inception Cohort. *Arthritis Care Res* 2019; 71: 893-902.
22. Lee SA, Kahng J, Kim Y, *et al.* Comparative study of immunofluorescent antinuclear antibody test and line immunoassay detecting 15 specific autoantibodies in patients with systemic rheumatic disease. *J Clin Lab Anal* 2012; 26: 307-14.
23. González DA, Rodríguez CC, Armas LM, *et al.* Anti-ENA profiles related with anti-SS-A/Ro. The detection of Ro52 and Ro60 according to the presence of SS-B/La, and ANA pattern and titer. *Immunol Lett* 2014; 161: 6-12.
24. Peek R, Pruijn GJ, van der Kemp AJ, van Venrooij WJ. Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J Cell Sci* 1993; 106: 929-35.
25. Keech CL, Gordon TP, McCluskey J. Cytoplasmic accumulation of the 52 kDa Ro/SS-A nuclear autoantigen in transfected cell lines. *J Autoimmun* 1995; 8: 699-712.
26. Tanaka M, Tanji K, Niida M, Kamitani T. Dynamic movements of Ro52 cytoplasmic bodies along microtubules. *Histochem Cell Biol* 2010; 133: 273-84.
27. Boccitto M, Wolin SL. Ro60 and Y RNAs: structure, functions, and roles in autoimmunity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2019; 54: 133-52.
28. Simons FH, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol* 1994; 125: 981-8.
29. Bahmer T, Romagnoli M, Girelli F, Claussen M, Rabe KF. The use of autoantibody testing in the evaluation of interstitial lung disease (ILD)--A practical approach for the pulmonologist. *Respir Med* 2016; 113: 80-92.
30. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, *et al.* Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol* 2018; 75: 1528-37.

31. de Andrade VP, De Souza FHC, Behrens Pinto GL, Shinjo SK. The relevance of anti-Jo-1 autoantibodies in patients with definite dermatomyositis. *Adv Rheumatol Lond Engl* 2021; 61: 12.
32. Irure-Ventura J, Rodríguez C, Vergara-Prieto E, *et al.* Rare immunofluorescence patterns of autoantibodies on HEp-2 cells defined by ICAP identify different autoimmune diseases in the absence of associated specificities: a Spanish multicentre study. *Rheumatol Oxf Engl* 2021; 60: 3904-12.
33. Aggarwal R, Dhillon N, Fertig N, Koontz D, Qi Z, Oddis CV. A Negative Antinuclear Antibody Does Not Indicate Autoantibody Negativity in Myositis: Role of Anticytoplasmic Antibody as a Screening Test for Antisynthetase Syndrome. *J Rheumatol* 2017; 44: 223-9.
34. Infantino M, Palterer B, Biagiotti R, *et al.* Reflex testing of speckled cytoplasmic patterns observed in routine ANA HEp-2 indirect immunofluorescence with a multiplex anti-synthetase dot-blot assay: a multicentric pilot study. *Immunol Res* 2018; 66: 74-8.
35. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 632-7.
36. Infantino M, Manfredi M, Grossi V, *et al.* An effective algorithm for the serological diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies: The key role of anti-Ro52 antibodies. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2017; 475: 15-9.
37. Marie I, Hatron PY, Dominique S, *et al.* Short-term and long-term outcome of anti-Jo1-positive patients with anti-Ro52 antibody. *Semin Arthritis Rheum* 2012; 41: 890-9.
38. Friedman AW, Targoff IN, Arnett FC. Interstitial lung disease with autoantibodies against aminoacyl-tRNA synthetases in the absence of clinically apparent myositis. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 26: 459-67.
39. Shao C, Sun Y, Huang H, *et al.* Myositis specific antibodies are associated with isolated anti-Ro-52 associated interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2022; 61: 1083-91.
40. Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, *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.
41. Wang Y, Luo P, Guo T, Zou L, Shi J, Chen P. Study on the correlation between anti-ribosomal P protein antibody and systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99: e20192.

42. Abdel-Nasser AM, Ghaleb RM, Mahmoud JA, Khairy W, Mahmoud RM. Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric and other manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 1377-85.
43. Pasoto SG, Viana VST, Bonfa E. The clinical utility of anti-ribosomal P auto-antibodies in systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol* 2014; 10: 1493-503.
44. Pisoni CN, Muñoz SA, Carrizo C, *et al.* Multicentric prevalence study of anti-P ribosomal autoantibodies in juvenile onset systemic lupus erythematosus compared with adult onset systemic lupus erythematosus. *Reumatol Clin* 2015; 11: 73-7.
45. Mahler M, Ngo JT, Schulte-Pelkum J, Luettich T, Fritzler MJ. Limited reliability of the indirect immunofluorescence technique for the detection of anti-Rib-P antibodies. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R131.
46. Ma L, Zeng A, Chen Y, Chen B, Zhou R. Anti-golgi antibodies: Prevalence and disease association in Chinese population. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2019; 496: 121-4.
47. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, *et al.* Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349: 1526-33.