การเปรียบเทียบการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี *Crithidia luciliae* Immunofluorescence Test และ Line Immunoblot Assay ในการวินิจฉัยโรค SLE และ Lupus Nephritis

วิศันสนีย์ การุญบุญญานันท์[1*] กิตติกร ดวงกำ[2] พิมพ์ชนก ตันติวงส์[2] มนสิตา ตันยะ[3] ญาดา ศิริพันธ์โนน[2] และ ธีรศักดิ์ พาจันทร์[4]

[1]กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
[2]หน่วยโรคข้อและรูมาติสซั่ม กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
[3]หน่วยโรคข้อและรูมาติสซั่ม กลุ่มงานกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
[4]วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดขอนแก่น คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก จังหวัดขอนแก่น

บทคัดย่อ

Anti-dsDNA เป็นเกณฑ์ที่สำคัญในการวินิจฉัยโรค SLE การตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี *Crithidia luciliae* immunofluorescence test (CLIFT) และ line immunoblot assay (LIA) ใช้แอนติเจนและหลักการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสอดคล้องของทั้งสองวิธี และศึกษาผลการวินิจฉัยโรคเมื่อผลไม่สอดคล้องกัน โดยพิจารณาผล anti-nucleosome และ anti-histone ร่วมด้วย โดยสืบค้นผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการย้อนหลังในผู้ป่วยที่แพทย์สงสัย SLE และส่งตรวจ anti-dsDNA ทั้งวิธี CLIFT และ LIA ในช่วง พ.ศ. 2561-2566 จำนวน 1,799 ราย และสืบค้นเวชระเบียนผู้ป่วยที่มีผลการตรวจทั้ง 2 วิธีไม่สอดคล้องกันหรือสอดคล้องกันบางส่วนรวม 300 ราย เพื่อดูผลการวินิจฉัยโรค วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ Cohen's kappa สถิติเชิงพรรณนา สถิติ Chi-square หรือ Fisher's exact test พบว่าวิธี CLIFT และ LIA มีความสอดคล้องกันปานกลาง (kappa = 0.548) เมื่อศึกษากลุ่มที่มีผล anti-dsDNA เป็นลบด้วยวิธี LIA 1,436 ราย พบว่าการพบ anti-nucleosome หรือ anti-histone มีโอกาสปานกลางที่จะพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT ($p < 0.001$) แต่หากทราบอยู่ก่อนแล้วว่ามีผล CLIFT เป็นบวก การพบแอนติบอดีทั้งสองชนิดไม่สามารถจำแนกผู้ป่วย SLE และ lupus nephritis (LN) ให้ชัดเจนขึ้นได้ ($p = 0.967$ และ 0.247 ตามลำดับ) กรณีที่ผลตรวจ anti-dsDNA ของทั้งสองวิธีไม่สอดคล้องกัน CLIFT สามารถจำแนก SLE และ LN ได้ชัดเจนกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และเมื่อตรวจสอบผลตรวจของแต่ละวิธีโดยทราบว่าอีกวิธีให้ผลเป็นบวกพบว่า ผลของ CLIFT ที่ต่างกันจำแนกผู้ป่วย SLE และ LN ได้ดี ($p < 0.001$ และ $p = 0.048$ ตามลำดับ) ขณะที่ LIA ไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน ($p = 0.748$ และ 0.095 ตามลำดับ) สรุปได้ว่าเมื่อผลตรวจ anti-dsDNA เป็นลบด้วยวิธี LIA หากผล anti-nucleosome หรือ anti-histone เป็นบวก จะมีโอกาสปานกลางที่จะตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และกรณี CLIFT เป็นบวกจะสามารถบ่งชี้ SLE และ LN ได้ชัดเจนขึ้น แต่หากมีผล anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT ที่เป็นบวกอยู่แล้ว ไม่จำเป็นต้องส่งตรวจวิธี LIA เพื่อดูผลของ anti-dsDNA, anti-nucleosome และ anti-histone สำหรับวินิจฉัย SLE อีก แนวทางนี้อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัย ลดค่าใช้จ่ายทางสุขภาพ และลดเวลาในการวินิจฉัยโรคได้

คำสำคัญ: การทดสอบไลน์อิมมูโนบล็อต การทดสอบอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้เชื้อ *Crithidia luciliae* ไตอักเสบลูปัส โรคเอสแอลอี แอนติบอดีต่อดีเอ็นเอสายคู่

*ผู้นิพนธ์หลัก: t.wisansanee@gmail.com
วันที่ส่ง: 28 ตุลาคม 2568 **วันที่แก้ไข:** 23 มีนาคม 2569 **วันที่ตอบรับ:** 25 มีนาคม 2569

Journal of the Medical Technologist Association of Thailand
Volume 54 No. 2 August 2026

A Comparative Analysis of Anti-dsDNA Testing by *Crithidia luciliae* Immunofluorescence Test and Line Immunoblot Assay for SLE and Lupus Nephritis Diagnosis

Wisansanee Karoonboonyanan[1*], Kittikorn Duangkum[2], Pimchanok Tantiwong[2], Manasita Tanya[3], Yada Siriphannon[2] and Teerasak Phajan[4]

[1]Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand
[2]Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand
[3]Division of Rheumatology, Department of Pediatrics, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand
[4]Sirindhorn College of Public Health Khon Kaen, Faculty of Public Health and Allied Health Sciences, Praboromarajchanok Institute, Khon Kaen Province, Thailand

Abstract

Anti-dsDNA is an important immunologic criterion for diagnosing SLE. *Crithidia luciliae* immunofluorescence test (CLIFT) and line immunoblot assay (LIA) detect anti-dsDNA by relying on different antigens and principles. This study evaluated the concordance between the two methods, and studied the final diagnosis when they disagreed, with consideration of whether anti-nucleosome and anti-histone were relevant. Laboratory results of Khon Kaen Hospital patients were retrieved for those suspected of SLE and whose anti-dsDNA tests were run for both CLIFT and via LIA, from 2018 to 2023. 1,799 cases in total. Of these cases, 300 cases where the results of both tests either disagreed or did not fully agree were checked for diagnosis in medical records and were analyzed using Cohen's kappa, descriptive statistics and Chi-square or Fisher's exact test. From total 1,799 cases, there was moderate agreement between the two methods (kappa = 0.548). From 1,436 cases with LIA-negative anti-dsDNA, detection of anti-nucleosome or anti-histone was significantly related to anti-dsDNA detection by CLIFT ($p < 0.001$) with moderate chance. However, if anti-dsDNA CLIFT was known positive (211 cases), detection of the two antibodies did not help identify SLE or lupus nephritis (LN) better ($p = 0.967$ and 0.247 respectively). When CLIFT and LIA disagreed, CLIFT identified SLE and LN significantly better ($p < 0.001$). Examining results of each method when the other was known positive showed that CLIFT identified SLE ($p < 0.001$) and LN ($p = 0.048$) well, while LIA did not ($p = 0.748$ and 0.095 respectively). In conclusions, when anti-dsDNA is negative in LIA test, the presence of anti-nucleosome or anti-histone implies moderate chance of positive anti-dsDNA if tested with CLIFT. And positive anti-dsDNA CLIFT result can then identify SLE and LN better. However, if anti-dsDNA CLIFT is known positive, further LIA test for anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-histone is not necessary for SLE diagnosis. This approach may optimize diagnostic efficiency, reduce healthcare costs, and shorten time to diagnosis.

Keywords: Line immunoblot assay, *Crithidia luciliae* immunofluorescence test, Lupus nephritis, Systemic lupus erythematosus disease, Anti-double-stranded DNA

*Corresponding author: t.wisansanee@gmail.com

Received date: October 28, 2025 **Revised date:** March 23, 2026 **Accepted date:** March 25, 2026

1. บทนำ

Anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) เป็นหนึ่งในแอนติบอดีที่จำเพาะกับโรค systemic lupus erythematosus (SLE) โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เป็นไตอักเสบลูปัส (lupus nephritis) ซึ่งมีพยาธิสภาพของโรคที่เกิดจากการมี immune complex ไปสะสมที่โกลเมอรูลัสและท่อไตทำให้เกิดภาวะไตอักเสบ โดยในผู้ป่วยที่เป็น active SLE และ active lupus nephritis สามารถตรวจพบ anti-dsDNA ได้ในระดับที่สูง[1,2] นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ anti-dsDNA ได้บ้างในผู้ป่วยโรค autoimmune rheumatic disease (ARD) ชนิดอื่น เช่น mixed connective tissue disease (MCTD), systemic sclerosis, Sjögren's syndrome, autoimmune myositis และ inflammatory arthritis หรือแม้แต่ในคนปกติก็อาจตรวจพบได้บ้าง[3]

คำแนะนำในการตรวจคัดกรอง antinuclear antibody (ANA) ด้วยวิธี indirect immunofluorescence assay (IFA) ระบุว่าในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการทางคลินิกที่สงสัย SLE และพบการติดสีในนิวเคลียสของ Hep-2 cells รูปแบบ homogeneous ควรตรวจ anti-dsDNA หรือแอนติบอดีต่อส่วนประกอบของ dsDNA/histone complexes (nucleosome) ร่วมด้วย[4] โดยในผู้ป่วย SLE และ active lupus nephritis สามารถตรวจพบ anti-nucleosome และ anti-histone ได้ในระดับที่สูงด้วยเช่นกัน[2] ซึ่ง anti-nucleosome ยังมีประโยชน์ในการช่วยจำแนกผู้ป่วย inactive SLE ซึ่งอยู่ในช่วงโรคสงบหรือไม่แสดงอาการที่มีความเสี่ยงสูงที่จะเป็น renal relapse ได้อีกด้วย[5]

จากเกณฑ์การวินิจฉัยโรค SLE ของ European League Against Rheumatism (EULAR) และ The American College of Rheumatology (ACR) ปี ค.ศ. 2019 ได้กำหนดให้การตรวจคัดกรอง ANA ด้วยวิธี IFA โดยใช้ Hep-2 cells เป็น substrate antigen ที่มีผลบวกไตเตอร์ตั้งแต่ 1 : 80 ขึ้นไป เป็นเกณฑ์การคัดเข้า (entry criterion) สำหรับการวินิจฉัยโรค SLE[6] โดย anti-dsDNA เป็นหนึ่งในแอนติบอดีจำเพาะที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ immunologic criterion สำหรับเกณฑ์การวินิจฉัย[6,7] รวมทั้งเกณฑ์ของ Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) ปี ค.ศ. 2012 ด้วย[8]

การตรวจ anti-dsDNA ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เพื่อช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรค SLE มีหลายวิธี เช่น *Crithidia luciliae* immunofluorescence test (CLIFT) โดยใช้หลักการ indirect immunofluorescence assay ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิม (traditional method) ที่มีการใช้เชื้อโพรโทซัว *Crithidia luciliae* ซึ่งมี kinetoplast ที่เป็น pure native double-stranded DNA เคลือบไว้บนแผ่นสไลด์เพื่อตรวจจับ anti-dsDNA ของผู้ป่วย วิธีนี้ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อดูสัญญาณการเรืองแสงของสารเรืองแสงที่ถูกติดไว้กับ anti-human IgG ที่จะจับกับ anti-dsDNA ที่ตรวจพบในซีรัมผู้ป่วย นอกจากนี้ยังมี immunoassay ที่เป็นวิธีทางเลือก (alternative method) ที่ถูกพัฒนาขึ้นอีกหลายวิธี โดยมีหลักการในการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน วิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (EIA), chemiluminescent immunoassay (CLIA) และ immunoblot เช่น line immunoblot assay (LIA) เป็นต้น โดยมีข้อเสนอแนะระดับนานาชาติในการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธีทางเลือกว่าอาจมีความจำเพาะต่ำ หากได้ผลเป็นบวกควรตรวจยืนยันด้วยวิธี CLIFT และรายงานผลแยกกัน โดยการตรวจด้วยวิธี CLIFT ควรรายงานผลเป็นเชิงปริมาณ (quantitative value) หรือเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative value) ด้วย[9]

การตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT เป็นวิธีที่มีความไวต่ำ แต่มีความจำเพาะค่อนข้างสูง โดยมีความจำเพาะอยู่ระหว่างร้อยละ 83.9-99.1[3,10-13] ในการวินิจฉัย SLE มีข้อเสนอแนะให้ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี CLIFT ร่วมกับวิธี EIA เพื่อช่วยเพิ่มค่าทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV) ให้สูงขึ้น[14] นอกจากนี้ความสอดคล้องของการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี immunoassay หลาย ๆ ชนิดกับวิธี CLIFT มีรายงานที่พบว่ามีความสอดคล้องกันอยู่ในระดับปานกลางถึงดี (kappa statistic 0.47-0.63) โดย EIA มีความสอดคล้องกับ CLIFT (ยี่ห้อ EUROIMMUN, Germany) ในระดับปานกลาง (kappa = 0.47)[11] และ immunoblot มีความสอดคล้องกับ CLIFT (ยี่ห้อ Bio-Rad Laboratories, Hercules CA) ในระดับปานกลางด้วยเช่นกัน (kappa = 0.55)[15]

วิธี LIA (EUROIMMUN, Germany) เป็นการตรวจวิเคราะห์แบบกึ่งปริมาณ ในชุดทดสอบมีการใช้ highly purified native, double-stranded DNA ที่สกัดจาก salmon testes เคลือบบนแผ่น immunostrip นอกจากนี้ยังมี nucleosome และ histone รวมทั้ง extractable nuclear antigen (ENA) อีกหลายชนิด เคลือบบนแผ่น immunostrip เดียวกัน เพื่อตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนดังกล่าวได้ในคราวเดียวกัน

วิธี CLIFT และ LIA ใช้แอนติเจน dsDNA และหลักการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน การรายงานผลของ CLIFT ต้องอาศัยการตัดสินใจของผู้ตรวจวิเคราะห์ (เป็น subjective judgement) ในขณะที่ LIA ใช้การอ่านระดับความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้น

จากปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกในรูปแบบกึ่งปริมาณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ซึ่งวิธี LIA จะมีการรายงานผลการตรวจ anti-dsDNA พร้อมกับแอนติบอดีจำเพาะอื่นคือ anti-ENA ใน immunostrip เดียวกัน ซึ่งรวมถึง anti-nucleosome และ anti-histone การส่งตรวจ anti-dsDNA เพื่อประกอบการวินิจฉัยโรค SLE ที่โรงพยาบาลขอนแก่น มีทั้งวิธี CLIFT และ LIA โดยแพทย์อาจส่งตรวจด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง หรือส่งทั้งสองวิธีร่วมกัน ขึ้นอยู่กับวิจารณญาณของแพทย์ ซึ่งอาจได้ผลการตรวจที่ไม่ตรงกัน และในการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการวัดความสอดคล้องของการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี immunoassay ซึ่งเป็นวิธีทางเลือกกับวิธี CLIFT ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่มีความจำเพาะสูง ส่วนใหญ่มีหลักการตรวจวิเคราะห์และยี่ห้อของน้ำยาที่ใช้ทดสอบแตกต่างกับที่ใช้ในโรงพยาบาลขอนแก่น โดยข้อมูลการเปรียบเทียบระหว่างวิธี LIA กับ CLIFT ยังมีค่อนข้างน้อย โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสอดคล้องของผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA กับวิธี CLIFT รวมทั้งศึกษาการกระจายตัวของระดับไตเตอร์ของ anti-dsDNA เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการตรวจพบ anti-dsDNA ที่ระดับไตเตอร์ต่าง ๆ เทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี LIA, ศึกษาความสัมพันธ์ของ anti-nucleosome และ anti-histone ต่อการตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT ในกรณีที่ LIA ให้ผล anti-dsDNA เป็นลบ, ศึกษาผลต่อการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis ในกรณีที่วิธี CLIFT ให้ผลเป็นบวกร่วมด้วย และศึกษาผลการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis ของผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ทั้งสองวิธีไม่สอดคล้องกัน เพื่อให้สามารถนำผลการวิเคราะห์นำเสนอและช่วยส่งเสริมการวินิจฉัย และการทำนายโรคในผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกต่อไป

2. วัสดุและวิธีการ

2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

สืบค้นข้อมูลย้อนหลังในทะเบียนบันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่แพทย์สงสัย SLE ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561-2566 โดยมีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และวิธี LIA โดย LIA มีผลการตรวจทั้ง anti-dsDNA, anti-nucleosome และ anti-histone จำนวน 1,799 ราย รายละเอียดการแบ่งกลุ่มตัวอย่างมีดังนี้

2.1.1 การประเมินความสอดคล้องของการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และ LIA ใช้กลุ่มตัวอย่างทั้ง 1,799 ราย

2.1.2 การศึกษาการกระจายตัวของระดับไตเตอร์ของผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT เปรียบเทียบกับ LIA ใช้กลุ่มตัวอย่างที่มีผลของวิธี CLIFT เป็นบวกและมีผลไตเตอร์ จำนวน 482 ราย

2.1.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของ anti-nucleosome และ anti-histone ต่อการตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT เมื่อ LIA ให้ผล anti-dsDNA เป็นลบ ใช้กลุ่มตัวอย่างที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA วิธี LIA เป็นลบ จำนวน 1,436 ราย

2.1.4 การศึกษาความสัมพันธ์ของ anti-nucleosome และ anti-histone ต่อการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis ในกรณีที่วิธี CLIFT ให้ผลเป็นบวก ใช้กลุ่มตัวอย่างที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA วิธี LIA ที่เป็นลบแต่ CLIFT ให้ผลเป็นบวกโดยมีผลไตเตอร์และผลการวินิจฉัยโรค จำนวน 211 ราย

2.1.5 จากกลุ่มตัวอย่างจำนวน 1,799 ราย เลือกกลุ่มตัวอย่างต่อไปนี้เพื่อค้นผลการวินิจฉัยโรค โดยกลุ่มที่มีผล CLIFT เป็นบวกเลือกเฉพาะกรณีที่มีรายงานผลไตเตอร์ร่วมด้วย เพื่อให้มีข้อมูลไตเตอร์ประกอบการวิเคราะห์:

กลุ่มที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และ LIA ไม่สอดคล้องกัน มีจำนวน 275 ราย แบ่งเป็น

- LIA Positive / CLIFT Negative จากจำนวน 70 ราย มีผู้ป่วย 6 รายที่ไม่มีข้อสรุปผลการวินิจฉัยโรค จึงไม่นำมาวิเคราะห์ เหลือจำนวน 64 ราย
- LIA Negative / CLIFT Positive จากจำนวน 237 ราย มีผลไตเตอร์จำนวน 212 ราย มีผู้ป่วย 1 รายที่ไม่มีข้อสรุปผลการวินิจฉัยโรค จึงไม่นำมาวิเคราะห์ เหลือจำนวน 211 ราย

กลุ่มที่มีผล anti-dsDNA เป็นบวกสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี โดย CLIFT ให้ผลเป็นบวกระดับต่ำกว่า 4+ ซึ่งมีจำนวน 25 ราย (กรณีที่ CLIFT ให้ผล 4+ และเป็นลบสอดคล้องกับ LIA ถือเป็นความสอดคล้องที่ชัดเจน จึงไม่นำมาค้นผลการวินิจฉัยโรค) รวมกลุ่มตัวอย่างที่นำไปค้นผลการวินิจฉัยโรคเป็นจำนวน 300 ราย

โครงการวิจัยนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น รหัสโครงการวิจัย KEXP66038 (ระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย พ.ศ. 2566-2568)

2.2 การตรวจวิเคราะห์ anti-dsDNA ด้วยวิธี *Crithidia luciliae* immunofluorescence test (CLIFT)

ตรวจวิเคราะห์ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปยี่ห้อ EUROIMMUN (Germany) ซึ่งใช้ซับสเตรตเป็น *Crithidia luciliae* เคลือบบนแผ่นสไลด์ ย้อมสไลด์เพื่อตรวจหา anti-dsDNA โดยเจือจางซีรัมผู้ป่วยเป็น single dilution ที่ 1 : 10 ด้วย phosphate buffer saline (PBS)-Tween 20 เติมซีรัมที่เจือจางแล้วให้ทำปฏิกิริยากับซับสเตรตแอนติเจน โดยบ่ม (incubate) ไว้ 30 นาที เพื่อให้แอนติบอดีที่คาดว่าจะมีในซีรัมทำปฏิกิริยากับซับสเตรตแอนติเจนที่เคลือบบนแผ่นสไลด์ ล้างซีรัมส่วนเกินออก จากนั้นเติมน้ำยา fluorescein-labelled anti-human IgG (goat) เพื่อติดตามการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยบ่มไว้อีก 30 นาที และล้างส่วนเกินออก ตรวจวิเคราะห์การติดสีฟลูออเรสเซนซ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยรายงานผลเป็นลบหรือบวก และประเมินระดับความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) จาก 1+ ถึง 4+ กรณีรายงานผลเป็นไตเตอร์จะเจือจางซีรัมเป็น dilution 1 : 100, 1 : 1,000 และ 1 : 10,000 และเทียบค่าเป็นไตเตอร์กับข้อเสนอแนะที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา (Recommended semiquantitative evaluation)

2.3 การตรวจวิเคราะห์ anti-dsDNA, anti-nucleosome และ anti-histone ด้วยวิธี line immunoblot assay (LIA)

ตรวจวิเคราะห์แอนติบอดีจำเพาะด้วยวิธี LIA โดยย้อมแผ่น immunostrip ซึ่งเคลือบแอนติเจนชนิด nRNP/Sm, Sm, SSA (Ro), Ro-52, SSB (La), Scl-70, Jo-1, centromere B, dsDNA, nucleosome, histone และ RIB-P ตามขั้นตอนในเอกสารกำกับน้ำยาของชุดน้ำยาสำเร็จรูป วิธี LIA ชนิด EUROLINE ANA Profile 1 (IgG) ยี่ห้อ EUROIMMUN (Germany) โดยเจือจางตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยเป็น single dilution ที่ 1 : 100 ด้วย sample buffer แล้วอบ (incubate) 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจำเพาะที่คาดว่าจะมีในซีรัม และล้างซีรัมส่วนเกินออก เติมน้ำยา enzyme conjugate ซึ่งเป็น alkaline phosphatase-labelled anti-human IgG (goat) อบไว้ 30 นาที และล้างส่วนเกินออก ขั้นตอนสุดท้ายเติมน้ำยาซับสเตรต ได้แก่ Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/BCIP) อบ 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น หากในซีรัมผู้ป่วยมีแอนติบอดีจำเพาะจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแต่ละชนิดที่เคลือบไว้บนแผ่น immunostrip และปรากฏแถบสีให้เห็น โดยอ่านระดับความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวกในรูปแบบกึ่งปริมาณ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป EUROLineScan รายงานผลเป็น negative, borderline, positive 1+, positive 2+ และ positive 3+ (strong positive) ข้อมูลในการศึกษานี้ไม่ได้รายงานผลเป็นไตเตอร์

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษานี้ประเมินความสอดคล้องของผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และ LIA โดยหาค่า percent agreement และสถิติ Cohen's kappa (unweighted kappa) และศึกษาการกระจายตัวของระดับไตเตอร์ของผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT จากกลุ่มตัวอย่างที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA เป็นลบและบวกที่ความเข้มของปฏิกิริยา (intensity) ระดับต่าง ๆ ได้แก่ borderline, 1+, 2+ และ 3+ โดยหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ในกรณีที่ LIA ให้ผล anti-dsDNA เป็นลบ ศึกษาความสัมพันธ์ของ anti-nucleosome และ anti-histone กับการตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และศึกษาความสัมพันธ์ของผลการตรวจ anti-nucleosome และ anti-histone แต่ละรูปแบบ กับการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis ในกรณีที่วิธี CLIFT ให้ผลเป็นบวกร่วมด้วย โดยใช้สถิติ chi-square หรือ Fisher's exact test และศึกษาผลการวินิจฉัยโรคทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ของทั้งสองวิธีที่ไม่สอดคล้องกัน เพื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของผลการตรวจของแต่ละวิธีกับผลการวินิจฉัยโรค โดยใช้สถิติ chi-square หรือ Fisher's exact test

3. ผลการวิจัย

3.1 ความสอดคล้องของการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และ LIA

จากการสืบค้นทะเบียนบันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยจำนวน 1,799 ราย ที่แพทย์สงสัยโรค SLE และส่งตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และตรวจแอนติบอดีจำเพาะ (anti-ENA) ด้วยวิธี LIA ซึ่งมีผลการตรวจ anti-dsDNA ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์บนแผ่น immunostrip เดียวกัน พบว่าการตรวจ anti-dsDNA ทั้งสองวิธีมีร้อยละของ

ความสอดคล้อง (% agreement) 82.9 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์แคปปา (Cohen's kappa) 0.548 (95% CI: 0.502-0.594) ซึ่งมีความสอดคล้องระดับปานกลาง อ้างอิงตามเกณฑ์ของ Landis และ Koch (ค.ศ. 1977)[16] (Table 1)

Table 1 Concordance of anti-dsDNA detection by CLIFT and LIA.

LIA	CLIFT		Total
	Positive	Negative	
Positive	293	70	363
Negative	237	1,199	1,436
Total	530	1,269	1,799
% agreement = 82.9			
kappa = 0.548 (95% CI: 0.502-0.594)			

Abbreviations: anti-dsDNA, anti-double-stranded DNA; CLIFT, *Crithidia luciliae* immunofluorescence test; LIA, line immunoblot assay

3.2 การกระจายตัวของระดับไตเตอร์ของผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT เปรียบเทียบกับ LIA

ไตเตอร์มีชั้นของข้อมูลที่เพิ่มแบบ exponential จึงปรับเป็น log scale (ฐาน 10) เพื่อให้วิเคราะห์แบบเลขคณิตเชิงเส้นได้ โดยผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA เป็นลบและบวก และ CLIFT ที่เป็นบวกและมีผลไตเตอร์ จำนวน 482 ราย พบว่ากรณีที่ตรวจไม่พบ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA วิธี CLIFT ตรวจได้ผลเป็นบวกที่ระดับไตเตอร์เฉลี่ย 110 โดยพบได้ตั้งแต่ไตเตอร์ระดับต่ำ ๆ คือ 10 ถึง 100 และระดับปานกลางถึงสูง (320 ถึง > 10,000) ส่วน anti-dsDNA ที่ตรวจด้วยวิธี LIA ที่ให้ผล borderline, positive ที่มีความเข้มของปฏิกิริยา 1+, 2+ และ 3+ เมื่อตรวจด้วยวิธี CLIFT มีระดับไตเตอร์เฉลี่ย 207, 359, 1,468 และ 9,899 ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Distribution of anti-dsDNA titers by CLIFT within each intensity level of LIA for the same cases.

anti-dsDNA titer by CLIFT		anti-dsDNA grading by LIA (n; %)				
Titer	Log scale titer	Negative	Borderline	1+	2+	3+
1 : 10	1.0	50; 23.7	2; 10.5	7; 12.7	0; 0.0	0; 0.0
1 : 32	1.5	25; 11.8	0; 0.00	3; 5.5	3; 3.6	0; 0.0
1 : 100	2.0	66; 31.3	5; 26.3	8; 14.5	5; 6.0	1; 0.9
1 : 320	2.5	27; 12.8	9; 47.4	10; 18.2	14; 16.7	1; 0.9
1 : 1000	3.0	27; 12.8	2; 10.5	19; 34.5	26; 31.0	14; 12.4
1 : 3200	3.5	3; 1.4	1; 5.3	2; 3.6	13; 15.5	8; 7.1
1 : 10000	4.0	12; 5.7	0; 0.0	6; 10.9	21; 25.0	47; 41.6
>1 : 10000	4.5	1; 0.5	0; 0.0	0; 0.0	2; 2.4	42; 37.2
Total (n = 482)		211; 100.0	19; 100.0	55; 100.0	84; 100.0	113; 100.0
Avg. Titer Log		2.04	2.32	2.55	3.17	4.00
(95% CI)		(1.92-2.15)	(2.05-2.58)	(2.34-2.79)	(3.01-3.33)	(3.89-4.09)
Avg. Titer*		110	207	359	1,468	9,899
(95% CI)		(84-143)	(112-378)	(221-610)	(1,028-2,154)	(7,720-12,295)

*Avg. Titer = $10^{AvgTiterLog}$

3.3 ความสัมพันธ์ของ anti-nucleosome และ anti-histone ต่อการตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT

จากกลุ่มตัวอย่าง 1,799 ราย ที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ทั้งด้วยวิธี CLIFT และ LIA มีผู้ป่วยที่มีผล LIA เป็นลบ 1,436 ราย ในจำนวนนี้ ตรวจพบ anti-nucleosome 246 ราย ซึ่งกลุ่มที่ตรวจพบ anti-nucleosome นี้ มีผลตรวจ CLIFT เป็นบวก 140 ราย คิดเป็นร้อยละ 56.9 ในขณะที่อีก 1,190 ราย ที่ตรวจไม่พบ anti-nucleosome มีผล CLIFT เป็นบวก 97 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.2 เมื่อวิเคราะห์สถิติไคสแควร์ พบว่าการตรวจพบ anti-nucleosome มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) สำหรับการตรวจ anti-histone ตรวจพบ 154 ราย โดยกลุ่มที่ตรวจพบ anti-histone มีผลตรวจ CLIFT เป็นบวก 74 ราย คิดเป็นร้อยละ 48.1 ในขณะที่อีก 1,282 รายที่ตรวจไม่พบ anti-histone มีผล CLIFT เป็นบวก 163 ราย คิดเป็นร้อยละ 12.7 เมื่อวิเคราะห์สถิติไคสแควร์ พบว่าการตรวจพบ anti-histone มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($p < 0.001$) (Table 3)

Table 3 Comparison of anti-dsDNA detection by CLIFT among cases negative by LIA, stratified by anti-nucleosome and anti-histone status.

Anti-dsDNA negative by LIA	Result	Cases (n/N; %)	Anti-dsDNA positive by CLIFT (n/N; %)	χ^2	df	*p*-value
Anti-nucleosome	Pos	246/1,436; 17.1	140/246; 56.9	351.709	1	< 0.001
	Neg	1,190/1,436; 82.9	97/1,190; 8.2			
Anti-histone	Pos	154/1,436; 10.7	74/154; 48.1	124.585	1	< 0.001
	Neg	1,282/1,436; 89.3	163/1,282; 12.7			

3.4 ความสัมพันธ์ของ anti-nucleosome และ anti-histone ต่อการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis

จากผู้ป่วย 211 ราย ที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA เป็นลบด้วยวิธี LIA แต่เป็นบวกด้วยวิธี CLIFT โดยมีผลไตเตอร์และผลการวินิจฉัยโรค เมื่อแยกพิจารณาผลการตรวจ anti-nucleosome และ anti-histone 4 กรณี พบว่า

กรณีที่ anti-nucleosome เป็นบวกเพียงอย่างเดียวมี 74 ราย คิดเป็นร้อยละ 35.1 ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น SLE 65 ราย คิดเป็นร้อยละ 87.8 และในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น lupus nephritis 38 ราย คิดเป็นร้อยละ 60.3

กรณีที่ anti-histone เป็นบวกเพียงอย่างเดียวมี 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.2 ในจำนวนนี้มีผู้ป่วย SLE 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 84.6 และในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น lupus nephritis 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 81.8

กรณีที่เป็นบวกทั้ง anti-nucleosome และ anti-histone มี 58 ราย คิดเป็นร้อยละ 27.5 ในจำนวนนี้มีผู้ป่วย SLE 51 ราย คิดเป็นร้อยละ 87.9 และในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น lupus nephritis 30 ราย คิดเป็นร้อยละ 60.0

กรณีที่เป็นลบทั้ง anti-nucleosome และ anti-histone มี 66 ราย คิดเป็นร้อยละ 31.3 ในจำนวนนี้มีผู้ป่วย SLE 59 ราย คิดเป็นร้อยละ 89.4 และในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น lupus nephritis 43 ราย คิดเป็นร้อยละ 72.9

เมื่อวิเคราะห์สถิติไคสแควร์ พบว่ากรณีที่ผลการตรวจ anti-dsDNA เป็นลบด้วยวิธี LIA แต่เป็นบวกด้วยวิธี CLIFT การตรวจพบ anti-nucleosome และ anti-histone รูปแบบต่าง ๆ ไม่นำไปสู่ความแตกต่างของผลการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.967$ และ $p = 0.247$ ตามลำดับ) (Table 4)

Table 4 SLE and lupus nephritis diagnosis by anti-nucleosome and anti-histone status in cases negative for anti-dsDNA by LIA but positive by CLIFT.

LIA of 3 autoantibodies (dsDNA/Nucleosome/Histone)	n; %	SLE diagnosis		Lupus nephritis diagnosis	
		Result	n; %	Result*	n; %
(-/+/-)	74; 35.1	SLE	65; 87.8	LN	38; 60.3
				non-LN	25; 39.7
		non-SLE	9; 12.2		
(-/-/+)	13; 6.2	SLE	11; 84.6	LN	9; 81.8
				non-LN	2; 18.2
		non-SLE	2; 15.4		
(-/+/+)	58; 27.5	SLE	51; 87.9	LN	30; 60.0
				non-LN	20; 40.0
		non-SLE	7; 12.1		
(-/-/-)	66; 31.3	SLE	59; 89.4	LN	43; 72.9
				non-LN	16; 27.1
		non-SLE	7; 10.6		
	211; 100.0	χ^2 = 0.263, df = 3, p = 0.967		χ^2 = 4.141, df = 3, p = 0.247	

*Excluding cases with no definite diagnosis for LN (3 cases)

Abbreviations: SLE, systemic lupus erythematosus.

3.5 การวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis ในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และ LIA ไม่สอดคล้องกัน

จากผลการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วย 300 ราย โดย 275 ราย มีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และ LIA ไม่สอดคล้องกัน พบว่าผลตรวจ CLIFT มีความสัมพันธ์กับผลการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) โดยหากทราบผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA ว่าเป็นบวก การตรวจเพิ่มด้วยวิธี CLIFT จะช่วยจำแนกผู้ป่วยที่อาจเป็นโรค SLE และ lupus nephritis ได้ชัดเจนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยเช่นกัน ($p < 0.001$ และ $p = 0.048$ ตามลำดับ) แต่หากทราบผลวิธี CLIFT ว่าเป็นบวก การตรวจเพิ่มด้วยวิธี LIA ไม่สามารถช่วยจำแนกผู้ป่วยที่อาจเป็นโรค SLE และ lupus nephritis ได้ชัดเจนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.748$ และ $p = 0.095$ ตามลำดับ) (Table 5)

Table 5 Chi-square analysis of SLE and lupus nephritis diagnosis for cases in which anti-dsDNA LIA and CLIFT test results disagree, and for cases in which one of the two is positive.

Anti-dsDNA detection		SLE Diagnosis			Lupus nephritis Diagnosis		
LIA	CLIFT	n/N; %	χ^2	p-value	n/N**; %	χ^2	p-value
Pos	Neg	18/64; 28.1	92.384	< 0.001	3/17; 17.6	15.090	< 0.001
Neg	Pos	186/211; 88.2			120/183; 65.6		
Pos	Neg	18/64; 28.1	29.522	< 0.001	3/17; 17.6	3.913	0.048
Pos	Pos	23/25; 92.0			11/23; 47.8		
Neg	Pos	186/211; 88.2	0.327	0.748*	120/183; 65.6	2.780	0.095
Pos	Pos	23/25; 92.0			11/23;47.8		

*Fisher's Exact Test

**Excluding cases with no definite diagnosis for LN (4 case)

ผู้ป่วยที่มีผลตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT เป็นบวก แต่ LIA ให้ผลเป็นลบ มีกลุ่ม non-SLE ร้อยละ 11.8 (25/211) ส่วนใหญ่เป็น systemic autoimmune rheumatic disease (SARD) ชนิดอื่น ได้แก่ MCTD, systemic sclerosis, rheumatoid arthritis, undifferentiated connective tissue disease และมี inflammatory rheumatic disease ได้แก่ peripheral spondyloarthritis โรค autoimmune vasculitis ได้แก่ Microscopic polyangiitis (MPA), Wegener's granulomatosis โรค immune-complex vasculitis ได้แก่ urticarial vasculitis รวมทั้ง membranoproliferative glomerulonephritis และ AIHA โดยมีโรคติดเชื้อบางชนิด เช่น syphilis, pulmonary tuberculosis, HIV นอกจากนี้ยังมี thalassemia และ hypothyroid เป็นต้น ส่วนผู้ป่วยที่มีผลตรวจ anti-dsDNA เป็นบวกทั้งสองวิธี พบว่ามี non-SLE ร้อยละ 8 (2/25) ได้แก่ Sjogren's syndrome และ urticarial vasculitis ส่วนกลุ่มที่มีผลตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT เป็นลบ แต่วิธี LIA ให้ผลเป็นบวกมี non-SLE ร้อยละ 71.9 (46/64) ซึ่งพบได้ทั้งโรคกลุ่ม ARD โรคติดเชื้อ โรคไตและโรคชนิดอื่น ๆ ก็สามารถพบได้

สรุปข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นผังงานเมื่อเริ่มจากมุมมองของ LIA ได้ดัง Fig. 1 และเมื่อเริ่มจากมุมมองของ CLIFT ได้ดัง Fig. 2

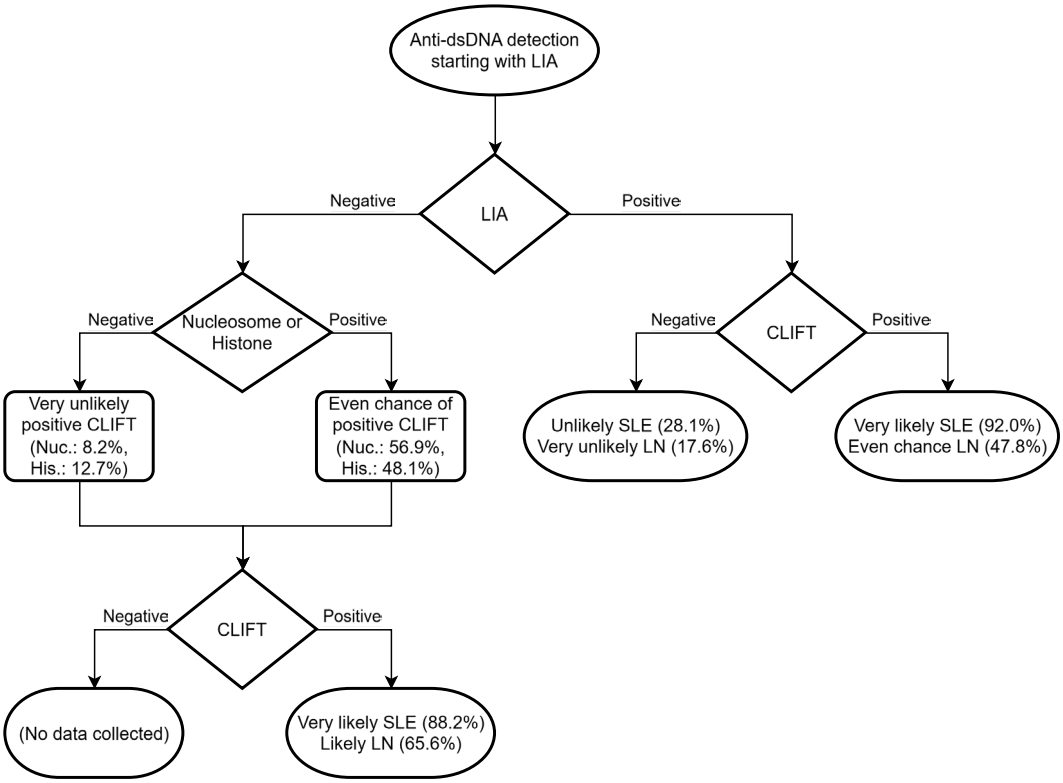


Fig. 1 Summary of observations in this study with LIA as the starting point.

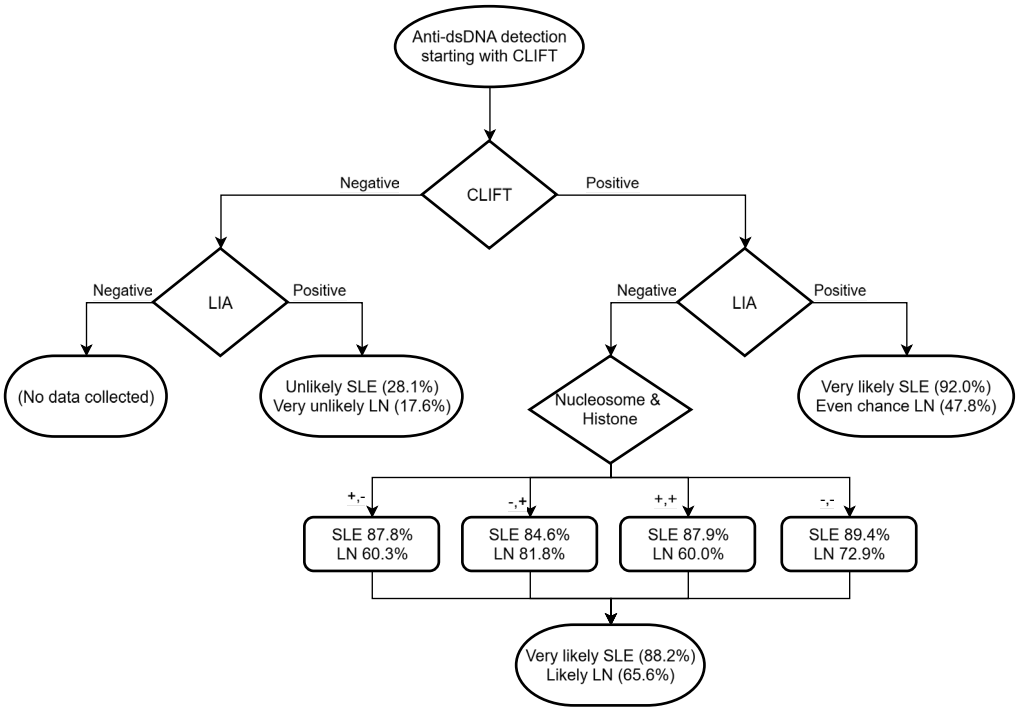


Fig. 2 Summary of observations in this study with CLIFT as the starting point.

4. วิจารณ์

จากการสืบค้นทะเบียนบันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย 1,799 ราย ที่แพทย์สงสัยโรค SLE และส่งตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT และตรวจ anti-ENA ด้วยวิธี LIA เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีจำเพาะ ซึ่งมีผลของ anti-dsDNA, anti-nucleosome และ anti-histone ร่วมด้วย พบว่า CLIFT และ LIA มีความสอดคล้องในการตรวจ anti-dsDNA ค่อนข้างสูงคือร้อยละ 82.9 ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Enocsson และคณะ ที่รายงานความสอดคล้องร้อยละ 81.0[12] แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Yang และคณะ ที่รายงานความสอดคล้องค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 53.8[17] ซึ่งทั้งสองการศึกษานี้ทดสอบวิธี LIA ด้วยน้ำยายี่ห้อเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้ (EUROLINE) แต่ตรวจวิธี CLIFT ด้วยน้ำยาต่างยี่ห้อกัน โดยมี *Crithidia luciliae* เป็นซับสเตรตแอนติเจนเหมือนกัน ในขณะที่การศึกษาของ Mahir และคณะ ใช้น้ำยาตรวจวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีเป็นยี่ห้อเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้ แต่มีความสอดคล้องสูงกว่าคือร้อยละ 86.1[18] ค่าความสอดคล้องที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องจากหลายปัจจัย เช่น ข้อจำกัดของวิธี CLIFT ที่ต้องอาศัยการตัดสินใจของผู้อ่านสไลด์ในการสรุปผลซึ่งเป็น subjective judgement อาจมีความเห็นที่แตกต่างกันได้ โดยเฉพาะกรณีที่มีการติดสีฟลูออเรสเซนซ์แบบก้ำกึ่งที่ยากในการตัดสินใจว่าจะให้ผลเป็นบวกหรือลบ นอกจากนี้การย้อมสีวิธี LIA ที่ทำได้ทั้งการย้อมด้วยมือ (แบบ manual) และย้อมด้วยเครื่องอัตโนมัติอาจมีผลต่อความแรงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะหากย้อมด้วยมืออาจมีความแปรปรวนในขั้นตอนการย้อมสีได้

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ Cohen's kappa พบว่า CLIFT และ LIA มีความสอดคล้องกันปานกลางในการตรวจ anti-dsDNA (kappa = 0.55) ซึ่งระดับความสอดคล้องของทั้งสองวิธีนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Cuomo และคณะ (kappa = 0.55) ที่ทดสอบในน้ำยาต่างยี่ห้อกับการศึกษาครั้งนี้ทั้งสองวิธี และได้มีข้อเสนอแนะให้ใช้ immunoblot เป็นวิธีเสริม (supporting assay) ในกรณีที่ CLIFT หรือ immunoassay ที่ใช้ร่วมกันให้ผลเป็นลบ[15] อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่ามีผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT เป็นลบแต่ LIA ให้ผลเป็นบวก และได้รับการวินิจฉัยว่าไม่ใช่ SLE สูงถึงร้อยละ 71.9 การวินิจฉัยผู้ป่วยกลุ่มนี้จึงยังต้องอาศัยการพิจารณาร่วมกับอาการทางคลินิก (clinical criteria) และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดอื่น (immunology criteria) ประกอบกัน ตามเกณฑ์การวินิจฉัยโรค SLE[6]

จากการศึกษาการกระจายตัวของระดับไตเตอร์ของ anti-dsDNA เทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี LIA พบว่ากรณีที่ผลตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA เป็นลบ วิธี CLIFT สามารถให้ผลเป็นบวกได้ที่ไตเตอร์เฉลี่ย 110 ซึ่งเป็นผู้ป่วย SLE สูงถึงร้อยละ

88.2 ส่วนกรณีที่ LIA ให้ผลก้ำกึ่ง (borderline) และเป็นบวกที่ความเข้มของปฏิกิริยา 1+, 2+ และ 3+ เมื่อตรวจด้วย CLIFT มีระดับไตเตอร์เฉลี่ย 207, 359, 1,468 และ 9,899 ตามลำดับ ซึ่งระดับความเข้มของปฏิกิริยาของ LIA อาจเทียบเป็นไตเตอร์ของ CLIFT ได้ไม่ชัดเจนนัก เนื่องจาก CLIFT มีการกระจายของระดับไตเตอร์ที่ไม่แน่นอน แต่ข้อมูลนี้อาจเป็นประโยชน์ในการทำ dilution ของ CLIFT เพื่อหาไตเตอร์ในกรณีที่ทราบผลความเข้มของปฏิกิริยาของ LIA โดยใช้เป็นตัวกำหนดเบื้องต้นว่าควรเจือจางซีรัมที่ dilution เท่าใดบ้าง เพื่อประหยัดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ เช่น หากความเข้มของปฏิกิริยาของ LIA เป็น 3+ ควรเจือจางซีรัมในการตรวจด้วยวิธี CLIFT เฉพาะที่ dilution 1 : 1,000 และ 1 : 10,000 เพื่อทำการทดสอบ เป็นต้น

ในกรณีที่ผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA เป็นลบ การศึกษาความสัมพันธ์ของการตรวจพบ anti-nucleosome และ anti-histone จากวิธี LIA กับการตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT พบว่ามีโอกาสปานกลางที่จะตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT ซึ่งแม้จะเป็นเพียงโอกาสปานกลาง ก็น่าจะยังเป็นประโยชน์สำหรับประกอบการวินิจฉัยโรค SLE เนื่องจากการตรวจพบ anti-dsDNA จัดเป็นหนึ่งในเกณฑ์การวินิจฉัย SLE ของ ACR/EULAR 2019[6] โดยแพทย์อาจพิจารณาส่งตรวจด้วยวิธี CLIFT เพิ่มเติม ซึ่งการศึกษานี้ยังพบว่าผลการตรวจ anti-dsDNA ที่เป็นบวกด้วยวิธี CLIFT มีความสัมพันธ์กับการวินิจฉัย SLE และ lupus nephritis อย่างมีนัยสำคัญ ดังจะกล่าวต่อไป

ในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA เป็นลบด้วยวิธี LIA แต่เป็นบวกด้วยวิธี CLIFT การศึกษาความสัมพันธ์ของการตรวจพบ anti-nucleosome หรือ anti-histone กับกระบวนการวินิจฉัย SLE และ lupus nephritis พบว่ารูปแบบการตรวจพบ anti-nucleosome หรือ anti-histone ไม่มีความสัมพันธ์กับการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis โดยสัดส่วนของการวินิจฉัยในแต่ละรูปแบบไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และมีค่าใกล้เคียงกับสัดส่วนการวินิจฉัยโดยรวมคือร้อยละ 88.2 และ 65.6 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ตรวจพบเฉพาะ anti-nucleosome มีผู้ป่วย SLE ที่เป็น lupus nephritis สูงถึงร้อยละ 60.3 และหากพบทั้ง anti-nucleosome และ anti-histone มีผู้ป่วยดังกล่าว ร้อยละ 60.0 (Table 4) แตกต่างจากข้อมูลในการศึกษาของ Yang และคณะ ที่เมื่อแยกพิจารณาเฉพาะข้อมูลที่การศึกษาครั้งนี้สนใจ (จาก Table 2 ของการศึกษาดังกล่าว) พบว่าในกรณีที่ผลตรวจ anti-dsDNA เป็นลบ สัดส่วนของผู้ป่วย lupus nephritis ในผู้ป่วย SLE ในกรณีที่ตรวจพบเฉพาะ anti-nucleosome เพียงอย่างเดียวมีเพียงร้อยละ 31.4 (22/70) และในกรณีที่ตรวจพบทั้ง anti-nucleosome และ anti-histone มีเพียงร้อยละ 40.0 (28/70)[19] โดยการศึกษาดังกล่าวพิจารณาเฉพาะผลของวิธี LIA ไม่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT มาประกอบ แสดงให้เห็นว่าวิธี CLIFT มีผลต่อความแตกต่างในกระบวนการวินิจฉัย lupus nephritis โดยช่วยจำแนกผู้ป่วย lupus nephritis ได้ในสัดส่วนที่สูงกว่า

กรณีที่ตรวจพบเฉพาะ anti-histone เท่านั้น การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถบ่งบอกโอกาสการวินิจฉัย SLE และ lupus nephritis ได้ เนื่องจากจำนวนกรณีทั้งหมดที่พบต่ำ ทำให้มาตราส่วนของสัดส่วนหยาบกว่ากรณีอื่น

กรณีที่ผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA และ CLIFT ไม่สอดคล้องกัน การศึกษานี้พบว่าผลการตรวจวิธี CLIFT มีความสัมพันธ์กับการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis มากกว่า ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าวิธี CLIFT มีความจำเพาะในการวินิจฉัยโรค SLE สูง[3,10-13] และหากทราบผลการตรวจด้วยวิธี CLIFT ว่าเป็นบวก การตรวจเพิ่มด้วยวิธี LIA ไม่สามารถจำแนกผู้ป่วย SLE และ lupus nephritis ให้ชัดเจนขึ้น เนื่องจากพบสัดส่วนการวินิจฉัยโรคที่ไม่แตกต่างกันไม่ว่า LIA จะบวกหรือลบ ทั้งนี้สามารถอธิบายเหตุผลเชิงเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างด้าน epitope ของแอนติเจนในชุดตรวจ โดยแอนติเจน dsDNA ของวิธี CLIFT ได้จากการใช้เชื้อโพรโทซัว *Crithidia luciliae* ซึ่งมี kinetoplast เป็น pure native dsDNA เคลือบบนแผ่นสไลด์ แอนติเจน dsDNA ที่ได้นี้มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ตามธรรมชาติ (native form) ไม่มีโปรตีน histone หรือโปรตีนอื่นปะปน[20] สามารถจับกับ anti-dsDNA ที่เป็น high-avidity antibody ที่ทำให้เกิดโรค โดยในผู้ป่วย SLE และ lupus nephritis จะมี anti-dsDNA ที่เป็น high-avidity antibody ชนิด IgG ที่จำเพาะและมีความแรงของพันธะทั้งหมดของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีสูงกับ dsDNA ของผู้ป่วยที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่ตามธรรมชาติ เกิดเป็น immune complex สะสมที่โกลเมอรูลัสและท่อไตทำให้เกิดการอักเสบของไต[21-23] ดังนั้นการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT ซึ่งใช้ Fluorescein-labelled anti-human IgG เป็น secondary antibody ในการตรวจจับ primary antibody คือ anti-dsDNA ของผู้ป่วย จึงสามารถตรวจพบ high-avidity antibody ชนิด IgG ที่ทำให้เกิดโรคได้ดี และมีความสัมพันธ์กับการวินิจฉัย SLE และ lupus nephritis มากกว่าวิธี LIA ที่ใช้ highly purified native dsDNA ที่สกัดจาก salmon testes เคลือบบนแผ่น immunostrip ซึ่งในกระบวนการผลิต immunostrip ดังกล่าว การดูดซับ dsDNA ลงบนพื้นผิวหรือการอบแห้ง อาจทำให้เกลียวคู่ของ dsDNA คลายตัวเป็น single-stranded DNA (ssDNA) หรือเสียสภาพบางส่วน

ได้[24] และเมื่อนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์อาจทำปฏิกิริยากับ anti-dsDNA ชนิด low-avidity ที่ไม่จำเพาะ ซึ่งอาจไม่มีความสัมพันธ์กับโรค SLE และ lupus nephritis[23]

กรณีที่ทราบผลการตรวจ anti-dsDNA วิธี LIA ว่าเป็นบวก การตรวจเพิ่มด้วยวิธี CLIFT จะช่วยจำแนกผู้ป่วยที่เป็นโรค SLE และ lupus nephritis ได้ชัดเจนขึ้น โดยเมื่อพิจารณาผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA เพียงวิธีเดียวและให้ผลเป็นบวก มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น SLE เพียงร้อยละ 46.1 (41/89) และด้วยข้อจำกัดของการศึกษานี้ที่มีข้อมูลการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วยที่มีผลตรวจ anti-dsDNA ที่เป็นลบของทั้งสองวิธีไม่ครบทุกราย จึงไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะจริงได้ แต่พออนุมานได้ว่าวิธี LIA น่าจะมีความจำเพาะต่ำในการวินิจฉัย SLE เนื่องจากมีผลบวกปลอมถึงร้อยละ 53.9 (48/89) ซึ่งสอดคล้องกับข้อเสนอแนะระดับนานาชาติที่ว่าเมื่อการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธีทางเลือกให้ผลเป็นบวก ควรมีการตรวจยืนยันด้วยวิธี CLIFT เนื่องจากมีความจำเพาะกับโรค SLE สูง[9]

สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น non-SLE การศึกษานี้พบว่ามีอยู่ร้อยละ 11.8 ของกรณีที่ตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT เพียงอย่างเดียว และร้อยละ 8 ของกรณีที่ให้ผลเป็นบวกทั้งสองวิธี โดยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยในกลุ่มโรค autoimmune rheumatic disease, vasculitis และอาจพบในโรคติดเชื้อและโรคชนิดอื่น ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Eriksson และคณะ ได้รายงานการตรวจพบ anti-dsDNA ก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการของโรคว่ามีโอกาสสูงที่จะพัฒนาไปเป็น SLE มากกว่าการตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะชนิดอื่น[25] โดยช่วงระยะเวลาระหว่างวันที่ตรวจพบ anti-dsDNA กับวันที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น SLE อาจมีความแตกต่างกัน (2.2-6.6 ปี)[25-27] ในขณะที่ Compagno และคณะ ได้รายงานผลการศึกษาที่พบว่าวิธี CLIFT มีค่าทำนายผลบวก (PPV) ที่ต่ำสำหรับการวินิจฉัยโรค SLE เนื่องจากผู้ป่วย non-SLE ที่มีผลการตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT ที่เป็นบวกมีความเสี่ยงต่ำที่จะพัฒนาไปเป็นโรค SLE ในระยะเวลา 5 ปี[28] ดังนั้น แม้ว่าการตรวจพบ anti-dsDNA จะช่วยบ่งชี้ความเสี่ยงล่วงหน้าต่อการดำเนินโรคไปเป็น SLE ได้ แต่ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นด้วย การแปลผลจึงควรพิจารณาร่วมกับอาการทางคลินิก ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น และการติดตามอาการอย่างต่อเนื่อง

5. สรุป

CLIFT ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมและ LIA ซึ่งจัดเป็นวิธีทางเลือก มีความสอดคล้องกันปานกลางในการตรวจ anti-dsDNA เมื่อเปรียบเทียบการตรวจพบ anti-dsDNA ในกรณีที่ทั้งสองวิธีได้ผลไม่สอดคล้องกัน พบว่าผลการตรวจ CLIFT มีความสัมพันธ์กับผลการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ผลการตรวจด้วยวิธี LIA ไม่มีความสัมพันธ์ดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ และกรณีที่ตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA ได้ผลเป็นลบ การพบ anti-nucleosome หรือ anti-histone มีโอกาสปานกลางที่จะตรวจพบ anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT แต่หากทราบอยู่ก่อนแล้วว่ามีผล anti-dsDNA เป็นบวกด้วยวิธี CLIFT รูปแบบการตรวจพบ anti-nucleosome และ anti-histone ไม่นำไปสู่ความแตกต่างของผลการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis อย่างมีนัยสำคัญ

ตามเกณฑ์การวินิจฉัย SLE ของ ACR/EULAR 2019 การตรวจพบ anti-dsDNA จัดเป็นหนึ่งใน Immunologic criterion จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการพิจารณาร่วมกับเกณฑ์ชนิดอื่นต่อไป แต่หากมีผล anti-dsDNA ด้วยวิธี CLIFT ที่เป็นบวกอยู่แล้ว ไม่จำเป็นต้องส่งตรวจแอนติบอดีจำเพาะด้วยวิธี LIA เพื่อที่จะดูผลของ anti-dsDNA, anti-nucleosome และ anti-histone สำหรับการวินิจฉัย SLE อีก เนื่องจากเป็นวิธีที่มีราคาต้นทุนสูงกว่ามาก ยกเว้นต้องการดูผลการตรวจแอนติบอดีจำเพาะชนิดอื่นที่อาจพบได้เพื่อประกอบการวินิจฉัย SLE

จากข้อสรุปดังกล่าว จึงเสนอเป็นแนวทางการส่งตรวจ anti-dsDNA ด้วยวิธี LIA และ CLIFT เพื่อประกอบการวินิจฉัยโรค SLE และ lupus nephritis ดัง Fig. 3 สำหรับกรณีที่เริ่มต้นจากวิธี LIA และ Fig. 4 สำหรับกรณีที่เริ่มต้นจากวิธี CLIFT

ทั้งนี้ นอกจากการตรวจ anti-dsDNA แล้ว เกณฑ์การวินิจฉัย SLE ของ ACR/EULAR 2019 ยังได้กำหนดให้ anti-Sm เป็นแอนติบอดีอีกชนิดหนึ่งที่จำเพาะกับโรค SLE แต่เนื่องจากการศึกษานี้ต้องการเปรียบเทียบการตรวจแอนติบอดีชนิดเดียวกันด้วยวิธีที่ต่างกัน การตรวจ anti-Sm จึงอยู่นอกเหนือขอบเขตของการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาผลของ anti-dsDNA ร่วมกับ anti-Sm อาจเป็นประเด็นสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป

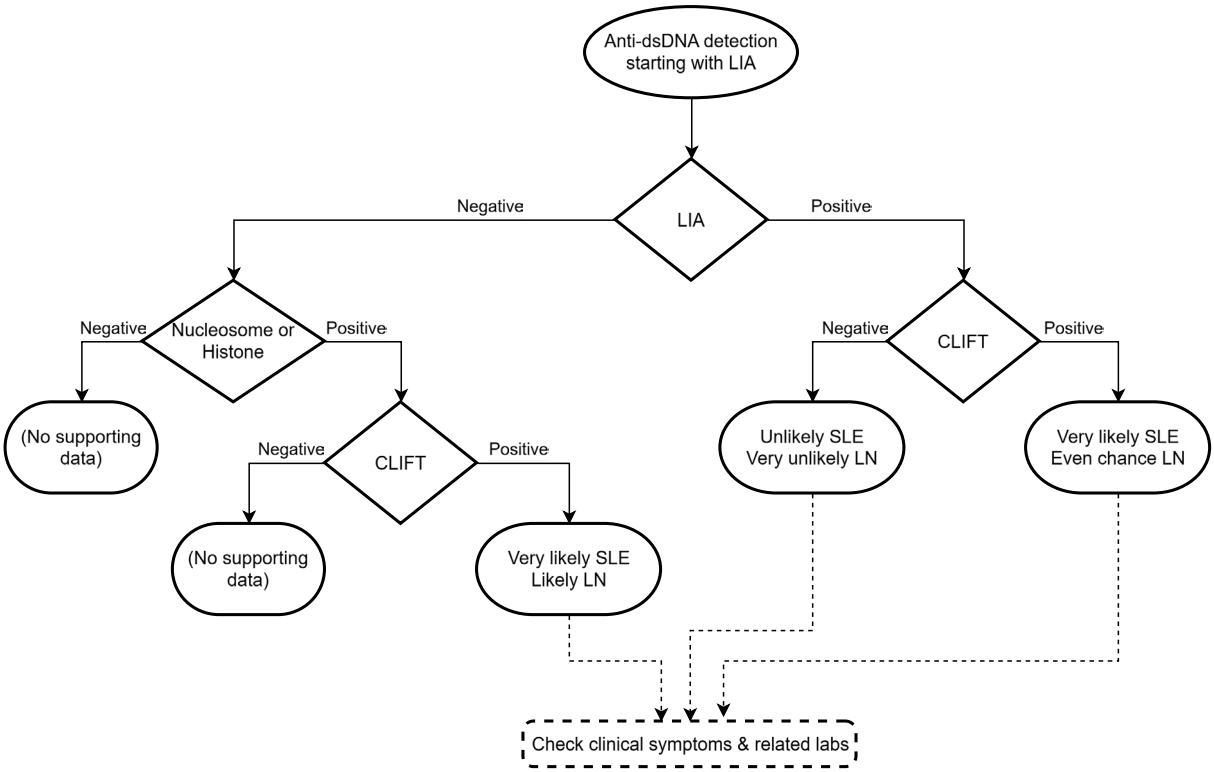


Fig. 3 Suggested flow for SLE and lupus nephritis diagnosis when starting anti-dsDNA detection with LIA.

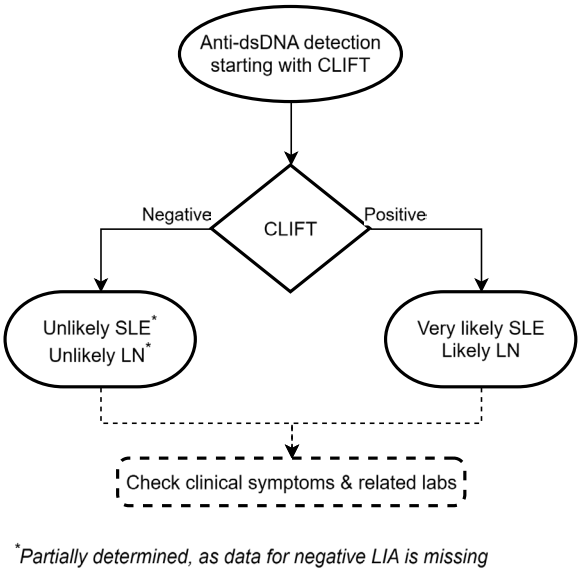


Fig. 4 Suggested flow for SLE and lupus nephritis diagnosis when starting anti-dsDNA detection with CLIFT.

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น ที่ได้กรุณาพิจารณาและให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงตามหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ขอขอบคุณโรงพยาบาลขอนแก่นที่ให้ความอนุเคราะห์เพื่อดำเนินการเก็บข้อมูลการวิจัย และขอขอบคุณบุคลากรกลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการสืบค้นข้อมูลเพื่อการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Wang X, Xia Y. Anti-double Stranded DNA Antibodies: Origin, Pathogenicity, and Targeted Therapies. Front Immunol 2019; 10: 1667.
2. Shang X, Ren L, Sun G, *et al*. Anti-dsDNA, anti-nucleosome, anti-C1q, and anti-histone antibodies as markers of active lupus nephritis and systemic lupus erythematosus disease activity. Immun Inflamm Dis 2021; 9: 407-18.
3. Infantino M, Palterer B, Previtali G, *et al*. Comparison of current methods for anti-dsDNA antibody detection and reshaping diagnostic strategies. Scand J Immunol 2022; 96: e13220.
4. 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.
5. Rodriguez-Jimenez NA, Perez-Guerrero EE, Gamez-Nava JI, *et al*. Anti-nucleosome antibodies increase the risk of renal relapse in a prospective cohort of patients with clinically inactive systemic lupus erythematosus. Sci Rep 2020; 10: 12698.
6. 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.
7. Infantino M, Nagy E, Bizzaro N, Fischer K, Bossuyt X, Damoiseaux J. Anti-dsDNA antibodies in the classification criteria of systemic lupus erythematosus. J Transl Autoimmun 2022; 5: 100139.
8. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, *et al*. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2012; 64: 2677-86.
9. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, *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.
10. Zhao J, Wang K, Wang X, *et al*. The performance of different anti-dsDNA autoantibodies assays in Chinese systemic lupus erythematosus patients. Clin Rheumatol 2018; 37: 139-44.
11. Infantino M, Manfredi M, Merone M, *et al.* Analytical variability in the determination of anti-double-stranded DNA antibodies: the strong need of a better definition of the old and new tests. Immunol Res 2018; 66: 340-7.
12. Enocsson H, Sjöwall C, Wirestam L, *et al*. Four Anti-dsDNA Antibody Assays in Relation to Systemic Lupus Erythematosus Disease Specificity and Activity. J Rheumatol 2015; 42: 817-25.
13. Orme ME, Voreck A, Aksouh R, Schreurs MWJ. Anti-dsDNA Testing Specificity for Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review. J Appl Lab Med 2022; 7: 221-39.

14. Nieto-Aristizábal I, España LJ, Ortega J, *et al*. Diagnostic Performance of Anti-dsDNA Tests by Indirect Immunofluorescence and Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. J Appl Lab Med 2023; 8: 713-25.
15. Cuomo L, Vitillo M, Della Rocca M, Trivedi P. Comparative analysis of three methods in anti-dsDNA antibodies detection: implications for Systemic Lupus Erythematosus diagnosis. Scand J Immunol 2022; 95: e13123.
16. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33: 159-74.
17. Yang J young, Oh EJ, Kim Y, Park YJ. Evaluation of Anti-dsDNA antibody tests: *Crithidia luciliae* immunofluorescence test, immunoblot, enzyme-linked immunosorbent assay, chemiluminescence immunoassay. Korean J Lab Med 2010; 30: 675-84.
18. MAHIR L, HSAI F ezzahra, BOURHANBOUR AD, BAKKOURI JE. Performance evaluation of immunoblot for the detection of anti-DNA antibodies compared to indirect immunofluorescence on *Crithidia luciliae.* J Hum Virol Retrovirol 2023; 10: 30-2.
19. Yang J, Xu Z, Sui M, *et al*. Co-Positivity for Anti-dsDNA, -Nucleosome and -Histone Antibodies in Lupus Nephritis Is Indicative of High Serum Levels and Severe Nephropathy. PloS One 2015; 10: e0140441.
20. Aarden LA, de Groot ER, Feltkamp TE. Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann N Y Acad Sci 1975; 254: 505-15.
21. Winfield JB, Faiferman I, Koffler D. Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. J Clin Invest 1977; 59: 90-6.
22. Swaak T, Smeenk R. Detection of anti-dsDNA as a diagnostic tool: a prospective study in 441 non-systemic lupus erythematosus patients with anti-dsDNA antibody (anti-dsDNA). Ann Rheum Dis 1985; 44: 245-51.
23. Nossent JC, Huysen V, Smeenk RJ, Swaak AJ. Low avidity antibodies to dsDNA as a diagnostic tool. Ann Rheum Dis 1989; 48: 748-52.
24. Butler JE. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. Methods San Diego Calif 2000; 22: 4-23.
25. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapää-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. Arthritis Res Ther 2011; 13: R30.
26. Arbuckle MR, James JA, Kohlhase KF, Rubertone MV, Dennis GJ, Harley JB. Development of anti-dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus. Scand J Immunol 2001; 54: 211-9.
27. 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.
28. Compagno M, Jacobsen S, Rekvig OP, *et al*. Low diagnostic and predictive value of anti-dsDNA antibodies in unselected patients with recent onset of rheumatic symptoms: results from a long-term follow-up Scandinavian multicentre study. Scand J Rheumatol 2013; 42: 311-6.