เปรียบเทียบวิธี reversed passive haemagglutination กับ counter-immunoelectrophoresis ในการตรวจหาแอนติเจนตับอักเสบบีชนิดผิว

สมหญิง ธัมวาสร*
สดใส เวชชาชีวะ*
ดิลก เย็นบุตร*

In a comparative evaluation of reversed passive haemagglutination and counter-immunoelectrophoresis, 115 sera of patients with suspected viral hepatitis were investigated for HB_sAg. The haemagglutination test achieved greater sensitivity than counter-immunoelectrophoresis, 27 sera clearly showed positive HB_sAg and 3 sera gave false positive, whereas counter-immunoelectrophoresis gave 15 positive sera. Both methods are simple and rapid. In spite of the high cost, reversed passive haemagglutination appears to be a more suitable test for blood-donor screening and diagnosis of acute infection than counter-immunoelectrophoresis on the ground of sensitivity. Adaptation of confirmatory testing of positive sera was also reported.

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นที่ยอมรับกันว่าแอนติเจนต้บอักเสบบีชนิดผิว (Hepatitis B surface antigen หรือ HB_sAg) ซึ่งแต่ก่อนเรียกกันว่า Australia antigen, hepatitis associated antigen หรือ serum hepatitis antigen (3) เป็นสิ่งที่บ่งชี้ถึงภาวะการติดเชื้อต้บอักเสบชนิดบี (4) การตรวจหาแอนติเจนนี้ในห้องปฏิบัติการจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยวินิจฉัยโรค วิธีการทดสอบเพื่อตรวจหาแอนติเจนต้บอักเสบบีชนิดผิวมีมากมายหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้ทดสอบกันทั่ว ๆ ไปมี 6 วิธี ได้แก่ immunodiffusion (5), counter–immunoelectrophoresis (7), complement fixation (10), reversed passive latex agglutination (9), reversed passive haemagglutination (6) และ radioimmunoassay (11)

Counter–immunoelectrophoresis เป็นวิธีการทดสอบที่ทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการทั่วไปเนื่องจากวิธีการง่าย รวดเร็ว มีความไวปานกลาง มีความจำเพาะแน่นอนสูง radioimmunoassay เป็นวิธีที่มีความไวมากที่สุดแต่มีข้อเสียคือเสียค่าใช้จ่ายสูงและอันตรายอันอาจจะเกิดขึ้นจากการปฏิบัติงานกับสารกัมมันตภาพรังสี สำหรับวิธี reversed passive haemagglutination นั้นพบว่าให้ผลดีมาก วิธีการง่าย ทำได้รวดเร็ว มีความไวสูงยิ่งถ้าใช้เม็ดเลือดแดงของมนุษย์เคลือบผิวด้วยแอนติบอดีย์ anti–HB_s ที่เตรียมจากหนูตะเภาจะให้ผลการทดสอบไวใกล้เคียงกับวิธี radioimmunoassay ถ้าใช้เม็ดเลือดแดงของแกะเคลือบผิวด้วยแอนติบอดีย์ anti–HB_s ที่เตรียมจากแกะจะให้ผลไวกว่าวิธี counter–immunoelectrophoresis เล็กน้อย ถ้าใช้เม็ดเลือดแดงของไก่งวงเคลือบด้วยแอนติบอดีย์ anti–HB_s ที่เตรียมจากม้าจะให้ผลที่ไวอยู่กึ่งกลางระหว่างรีเอเจนท์ทั้งสองที่กล่าวถึงนั้น (4)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อจะเปรียบเทียบค่าของวิธี reversed passive haemagglutination ในแง่ของความไว ความรวดเร็ว ความสะดวกง่ายดาย และค่าใช้จ่ายเทียบกับวิธี counter–immunoelectrophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่ทำอยู่เป็นประจำของแผนกจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในการตรวจหาแอนติเจนต้บอักเสบบีชนิดผิว

วัสดุและวิธีการ

น้ำซีรั่มของผู้ป่วยจำนวน 115 ราย ซึ่งแพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น (ทั้งผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน) สงสัยว่าเป็นโรคต้บอักเสบจากไวรัสมาตรวจหาแอนติเจนต้บอักเสบบีชนิดผิว โดยวิธี counter–immunoelectrophoresis และวิธี

reversed passive haemagglutination ระหว่าง ม.ค. ถึง มี.ค. 2521

Counter-immunoelectrophoresis(CIE): เป็นการทดสอบที่ทำเป็นประจำอยู่แล้วในแผนกจุลชีววิทยา โดยใช้แอนติบอดีย์จาก pooled human sera ที่มีแอนติบอดีย์ต่อแอนติเจนต้านอักเสบบีชนิดผิว (7)

Reversed passive haemagglutination (RPHA): ใช้ HA screening kit หรือ Hepa-test screening kit ของ Wellcome จาก Wellcome Research Laboratories Beckenham England (2) มี test cell เป็นเม็ดเลือดแดงของไก่งวงเคลือบผิวด้วย anti-HB_s ที่เตรียมจากม้า control cell เป็นเม็ดเลือดแดงของไก่งวงเคลือบผิวด้วย normal globulin ของม้า วิธีการทดลองขั้นแรกทำ screening test เสียก่อน โดยทำซีรั่มให้เจือจางเป็น 1 : 8 ด้วย diluent buffer ใน microtiter plate หลังจากให้ทำปฏิกิริยากับ test cell เป็นเวลา $\frac{1}{2}$–1 ชั่วโมง จึงนำมาอ่านผลดูการเกาะกลุ่มตกตะกอน รายที่ให้ผลบวกต้องนำมาทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผล

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสอบยืนยันผลเป็น 2 วิธีคือ วิธีแรกนำซีรั่มมาทำให้เจือจาง 2 ชุด เป็น 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8,.....1 : 256 แล้วให้ทำปฏิกิริยากับ test cell เทียบกับ control cell ถ้าซีรั่มทำปฏิกิริยากับ test cell ให้ไตเตอร์สูงกว่าทำกับ control cell อย่างน้อย 4 เท่าจึงถือว่าให้ผลบวก ถ้าไม่ถึง 4 เท่าถือว่าเป็น false positive จึงนำซีรั่มมาทำให้เจือจางเพียงชุดเดียวก่อนแล้วทดสอบกับ control cell อย่างเดียว ถ้าได้ผลบวกที่ 1 : 2 หรือให้ผลลบให้แปลผลว่าการทดสอบให้ผลบวกได้เลย ถ้าได้ผลบวกที่สูงกว่า 1 : 2 จึงนำซีรั่มมาทำปฏิกิริยากับ test cell แล้วจึงแปลผล วิธีที่สองให้ absorb ซีรั่มเสียก่อนด้วย control cell ใช้สัดส่วน 1 : 5 แล้วทำให้เจือจางเป็น 1 : 8 ด้วย diluent buffer ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำมาปั่นให้เซลตกแล้วนำน้ำใสส่วนบนมาทำปฏิกิริยากับ test cell ถ้าให้ผลบวกก็แปลผลว่าการทดสอบให้ผลบวก ถ้าให้ผลลบถือว่าเป็นfalse positive

ผล

จากการทดสอบซีรั่มทั้งหมด 115 ราย ปรากฏว่า พบผลบวกจากวิธี counter–immuno-electrophoresis 15 ราย (13.04%) และจากวิธี rapid passive haemagglutination 27 ราย (23.48%) วิธี rapid passive haemagglutination ให้ false positive 3 ราย (2.61%) ดังแสดงไว้ในตาราง ซีรั่ม 15 รายที่พบผลบวกจากวิธี counter immunoelectrophoresis ก็ตรวจพบผลบวกจากวิธี rapid passive haemagglutination ทุกราย มีซีรั่มที่ให้ผลบวกเฉพาะเมื่อทดสอบด้วยวิธี reversed passive haemagglutination เท่านั้น 12 ราย และไม่มีซีรั่มใดให้ผลบวกเฉพาะเมื่อทดสอบด้วยวิธี counter–immunoelectrophoresis

ตาราง ผลการตรวจพบแอนติเจนต้านอักเสบบีชนิดผิว (HB_sAg) ด้วยวิธี counter–immuno-electrophoresis และวิธี reversed passive haemagglutination

วิธีการ	รายที่ให้ผลบวก	%
Counter–immunoelectrophoresis	15	13.04
Reversed passive haemagglutination		
HB_sAg	27	23.48
False positive	3	2.61

วิจารณ์

การศึกษานี้ศึกษาเปรียบเทียบแต่คุณค่าของวิธีการทางห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่ได้พิจารณาถึงอาการและความรุนแรงของโรคเลย จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าวิธี reversed passive haemagglutination มีความไวกว่าวิธี counter–immunoelectrophoresis อย่างเห็นได้ชัด เมื่อนำข้อมูลมาทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Chi square พบว่าวิธีreversed passive haemagglutination มีความไวกว่าวิธี counter–immunoelectrophoresis อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) หรือถ้าจะอธิบายในแง่ประสิทธิภาพแล้วถ้าวิธี reversed passive haemagglutination มีประสิทธิภาพ 100 % วิธี counter–immunoelectrophoresis จะมีประสิทธิภาพเพียง 55.55% หรือวิธี reversed passive haemagglutination มีความไวเป็น 1.8 เท่าของวิธี counter–immunoelectrophoresis เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น ๆ พบว่าผลของการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับรายงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (1) ซึ่งทำการศึกษาในซีรั่มของผู้บริจาคเลือด 176 ราย พบผลบวกโดยวิธี counter–immunoelectrophoresis 10 ราย และโดยวิธี reversed passive haemagglutination 16 ราย คิดเป็น 1.6 เท่าของวิธี counter–immunoelectrophoresis ส่วนรายงานของโรงพยาบาลศิริราช (12) และของ Cazer และผู้ร่วมงาน(6)พบว่า reversed passive haemagglutination มีความไวเป็น 1.2 และ 1.33 เท่าของวิธี counter–immunoelectrophoresis ตามลำดับ วิธีการทดสอบทั้งสองวิธีทำได้ง่ายวิธีการไม่ยุ่งยาก counter–immunoelectrophoresis แม้จะมีความไวน้อยกว่าแต่มีความจำเพาะเจาะจงสูงมาก (4) วิธี reversed passive haemagglution เมื่อทำ screening test อาจให้ผลบวกหลอก เนื่องจากซีรั่มของคน

ปกติอาจทำปฏิกิริยากับ globulin ของม้าหรือเม็ดเลือดแดงของสัตว์ได้จึงต้องนำมาทดสอบเพื่อยืนยันผลอีก จะเสียเวลาในการทดลองมากกว่าวิธี counter–immunoelectrophoresis ในขั้นตอนทดสอบเพื่อยืนยันผลตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตให้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการทดสอบดูว่าซีรั่มเมื่อทำปฏิกิริยากับ test cell จะให้ไตเตอร์สูงกว่าเมื่อทำปฏิกิริยากับ control cell 4 เท่าเป็นอย่างน้อย และขั้นตอนที่เป็นการทำ absorption test โดยใช้ confirmatory kit ซึ่งผลิตขายเป็นอีกชุดหนึ่ง การศึกษาครั้งนี้พิสูจน์ยืนยันผลโดยทำขั้นตอนที่ 1 ส่วนขั้นตอนที่ 2 ได้ดัดแปลงใช้ control cell ใน screening kit absorb ซีรั่มแทน แม้ว่าจะมีความเจือจางกว่าเซลที่ใช้ใน confirmatory kit ประมาณ 10 เท่า จากการทดลองก็ปรากฏว่าการพิสูจน์เพื่อยืนยันให้ผลตรงกันทั้ง 2 ขั้นตอน ในซีรั่มที่ให้ผลบวกจริงและผลบวกหลอก ในเรื่องของค่าใช้จ่ายวิธี counter–immunoelectrophoresis เสียค่าใช้จ่ายประมาณตัวอย่างละ 5 บาท ซึ่งนับว่าถูกมากและไม่ต้องซื้อรีเอเจนท์จากต่างประเทศ ส่วนวิธี reversed passive haemagglutination ต้องสั่งซื้อชุดจากต่างประเทศ บางครั้งไม่สะดวกต้องมีการรอคอยและในเรื่องราคานั้นการทำ screening test 1 ตัวอย่างเสียค่าใช้จ่ายประมาณ 30 บาท ถ้าทำการพิสูจน์ยืนยันผลด้วยตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตจะเสียค่าใช้จ่ายถึง 390 บาท (screening test 30 บาท หาไตเตอร์ของซีรั่ม 240 บาท confirm test 120 บาท) ถ้าวิธีการ absorb ซีรั่มด้วย control cell ดังกล่าวมาแล้วในการทดลองครั้งนี้ได้ผล 100% จะเสียค่าใช้จ่ายเพียงตัวอย่างละ 60 บาท (screening test 30 บาท วิธี absorb 30 บาท) จึงน่าที่จะทำการศึกษาเปรียบเทียบต่อไปให้ได้ข้อมูลเพิ่มขึ้นพอที่จะกล่าวยืนยันได้แน่นอนว่าวิธี absorb ด้วย control cell ใน screening kit นี้ใช้ได้จริง

อย่างไรก็ตามการตรวจหาแอนติเจนตับอักเสบบีชนิดผิวโดยเฉพาะในผู้บริจาคเลือดควรนำวิธี reversed passive haemagglutination มาใช้โดยทำเพียง screening test แม้ว่าค่าใช้จ่ายจะสูงเป็น 6 เท่าของวิธี counter–immunoelectrophoresis สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงนอกจากค่าใช้จ่ายคือเรื่องความไวของวิธีทดสอบ มีรายงานว่าในการให้เลือด แม้ว่าผู้รับเลือดจะได้รับเลือดที่ได้ทำการตรวจโดยวิธีที่ไวที่สุดคือ radioimmunoassay ว่าปราศจากแอนติเจนแล้วก็ตาม ก็ยังมีผู้รับเลือดจำนวนหนึ่งป่วยเป็นโรคตับอักเสบอยู่เสมอ (8) การทำ screening test อาจให้ผลบวกหลอกบ้าง Cazer และผู้ร่วมงาน (6) รายงานว่าพบ 0.25% จาก

การทำในผู้บริจาคเลือด 14,393 ราย ในการศึกษาครั้งนี้พบผลบวกหลอก 2.61% การคัดเลือกเลือดที่ไม่มีแอนติเจนออกก็ยังดีกว่าจะคัดเลือดที่มีแอนติเจนเข้ามาเป็นจำนวนมาก ในเรื่องของการตรวจวินิจฉัยซีรั่มผู้ป่วยนั้น ในรายที่การดำเนินของโรคเป็นแบบปัจจุบัน เวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างตรวจจะมีอิทธิพลอย่างมากต่อความยากง่ายในการตรวจหาแอนติเจน ทั้งนี้เนื่องจากระดับแอนติเจนสูงที่สุดนั้นจะเกิดขึ้นตอนเริ่มมีอาการของโรคหรือก่อนจะมีอาการเสียด้วยซ้ำ การเก็บเลือดเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคนั้นมักจะเก็บเมื่อป่วยมาแล้วหลายวันหรือหลายสัปดาห์หลังมีอาการ วิธีการที่นำมาทดสอบที่ไวที่สุดเท่านั้นจึงจะเป็นวิธีที่เหมาะสมเพื่อให้ได้การวินิจฉัยโรคที่จำเพาะได้ถูกต้องแน่นอนที่สุดสำหรับในรายที่มีภาวะติดเชื้อปัจจุบัน (4) จึงน่าจะนำวิธี reversed passive haemagglutination เฉพาะ screening test มาใช้ทดสอบเสียก่อน ถ้าให้ผลบวกจึงทดสอบซ้ำด้วยวิธี counter-immunoelectrophoresis เมื่อ counter-immunoelectrophoresis ให้ผลบวกด้วยจะเป็นการพิสูจน์ยืนยันผลว่าบวกจริง ถ้า counter-immunoelectrophoresis ให้ผลลบควรจะพิสูจน์ยืนยันว่าบวกจริงโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงดังกล่าวข้างต้นจะลดค่าใช้จ่ายลงได้มาก

อ้างอิง

1. จันทนา คุณเอนก, บุญส่ง พจนการุณ และนาที่รัตน์ สังขวิภา : การตรวจแอนติเจนตับอักเสบชนิดบีด้วยวิธี CIEP และ RPHA วารสารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 21 (4) : 235-237, 2522.
2. Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK : Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. J Immunol 109 (4) : 842-848, 1972.
3. Cayzer I, Dane DS, Cameron CH, et al : A rapid haemagglutination test for hepatitis B antigen. Lancet 1 : 947-949, 1974.
4. Gocke DJ, Howe C : Rapid detection of Australia antigen by counterimmuno-electrophoresis. J Immunol 104 (4) : 1031-1032, 1970.
5. Hepatitis B antigen HA screening kit. Leaflet of Wellcome Research Laboratories Beckenham, England.
6. Hollinger FB, Werch J, Melnick J : Evidence that double-autibody rodioimmuno-assay reduces the incidence of post-transfusion hepatitis B. N Engl J Med : 290 (20) : 1104-1109, 1974.
7. Lehmann NI, Gust ID : An evaluation of the use of sensitized latex particles for the detection of the hepatitis-associated antigen. Pathology 5 : 243-8, 1973.
8. Nathalie JS, Lennette EH : Complement fixation and immunodiffusion tests for assay of hepatitis-associated "Australia" antigen and antibodies. J Immunol 105 (3) : 604-613: 1970.
9. Nomenclature of antigen associated with viral hepatitis type B. (News) Infect Dis 130 (1) : 92, 1974.
10. Viral Hepatitis : Report of a WHO Meeting. WHO Tech Rep Ser (570) : 5-48, 1975.
11. Walsh JH, Rosalyn Y. Solomon BA. Detection of Australia antigen and antibody by means of radioimmunoassay techniques. J Infect Dis 121 (5) : 550-554, 1970.
12. Wasi C, Chandanayingyong D, Imwitaya S, et al : Evaluation of rapid hemagglutination test for hepatitis B surface antigen. J Med Ass Thai 60 (5) : 205-207. 1977.