

บทที่ 3

ผลการทดลอง

I ผลการตรวจ ACAs

จากคนไข้ที่มี ANA positive ที่ titer > 1:320 นำมาตรวจ ACAs ให้ผล OD สูงสุด 0.753 จึงนำมาใช้เป็น positive control ในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบต่อไป ผู้ป่วยรายนี้มี ANA ให้ผลบวก 1:640 VDRL non-reactive ,TPHA และ FTA -ABS non-reactive และเวลาที่เหมาะสมในการอ่านสี substrate ที่ 30 นาที

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ เพื่อตรวจกรอง ACAs ได้ผลดังนี้(รูปที่ 8)

1.1 cardiolipin ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่า OD สูงกว่าความเข้มข้น 45 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ทั้งในคนปกติ และ positive serum แต่ cardiolipin ความเข้มข้น 45 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ยังคงแสดงความแตกต่างระหว่าง negative และ positive ได้ชัดเจน จึงเลือกใช้ cardiolipin ความเข้มข้น 45 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เพื่อใช้เคลือบหลุมในการศึกษาต่อไป

1.2 ปริมาณ adult bovine serum (ABS) ใน PBS ที่ใช้เป็น diluent สำหรับซีรัมและ conjugate พบว่าการใช้ 10% ABS-PBS ให้ OD ต่ำกว่าการใช้ 5% ABS-PBS เพียงเล็กน้อย ทั้งในซีรัมคนปกติและ positive serum จึงเลือกใช้ 5% ABS-PBS ซึ่งให้ OD สูงกว่าเล็กน้อย แต่ยังคงแยกแยะระหว่าง negative และ positive ได้ชัดเจน

1.3 ความเจือจางของซีรัมที่เหมาะสมในการทดสอบ พบว่าการเจือจางซีรัม

1:100 positive serum ให้ OD ต่ำกว่าซีรัมที่เจือจาง 1:50 และการแยกระหว่างบวกและลบชัดเจน เลือกใช้ dilution 1:50 ในการศึกษาคต่อไป

1.4 ความเข้มข้นของ peroxidase conjugated goat antihuman IgG, IgA, IgM พบว่า ความเข้มข้น 1:500 ให้ OD สูงสุด ในทุก condition และให้ OD ใน normal serum ค่อนข้างสูง ส่วนความเข้มข้น 1:1000 ให้ OD ระหว่าง normal และ positive serum ยังสามารถ แยกกันได้ชัดเจน จึงเลือกใช้ ความเข้มข้น 1:1000 ในการศึกษาคต่อไป

ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการหา isotype specific ACAs ใช้ condition เดียวกับที่หา ACAs polyvalent แต่หา cut off level ใหม่

สรุปขั้นตอนสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ ACAs ในการศึกษานี้แสดงไว้ในตารางที่ 5

2. ผลการตรวจ ACAs ในคนปกติ

จากการตรวจ ACAs ในคนปกติ (polyvalent IgG, IgA, IgM) 111 ราย มีค่า O.D. เป็นค่าเฉลี่ย + 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.368 ในทำนองเดียวกัน เมื่อตรวจ ACAs isotype ต่างๆในคนปกติ 24 ราย ได้ค่า cut off = 0.216 , 1.126 และ 0.231 สำหรับ ACAs Isotype IgG, IgA และ IgM ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 และรูปที่ 9

3. ผลการตรวจ ACAs ในคนไข้กลุ่มต่างๆ

3.1 คนไข้ SLE (รูปที่ 10)

คนไข้ SLE มี 2 กลุ่มคือกลุ่มซึ่งมาติดตามการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอก 81 ราย อายุระหว่าง 16-57 ปี ให้ผลบวก ACAs 11/81 ราย = 13.58% ให้ false positive

VDRL 1 ราย (TPHA และ FTA-ABS non-reactive) ค่าเฉลี่ย OD ในกลุ่มนี้ต่างกับคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .01$) (wr)

คนไข้ SLE กลุ่มที่รับการรักษาอยู่ในโรงพยาบาลจำนวน 19 คน ให้อาการ ACAs $6/19 = 31.57\%$ ในกลุ่มนี้แบ่งเป็นกลุ่มที่มีอาการทางระบบประสาท 9 คน ให้อาการ ACAs $3/9 = 33.3\%$ และไม่มีอาการทางระบบประสาทร่วมด้วยและ ACAs ให้อาการ $3/10 = 30\%$ ค่าเฉลี่ย OD ในกลุ่มนี้แตกต่างกับคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .0526$)

3.2 ผลการตรวจ ACAs ในคนไข้ที่มีอาการแทรกซ้อนจากการได้รับ Semple vaccine (รูปที่ 11)

จากผลการศึกษาคนไข้ที่ได้รับ Semple vaccine ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าในกลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนมากพบ ACAs สูงกว่าระดับปกติ $16/25$ ราย = 64% และกลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนน้อยพบ ACAs สูงกว่าระดับปกติ $2/21$ ราย = 9.5% ในกลุ่มที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนจากการได้รับ vaccine ไม่พบ ACAs สูงกว่าระดับปกติเลย เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ OD ระหว่างกลุ่มต่อกันพบว่า กลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนมากมีค่าเฉลี่ยของ OD แตกต่างกับกลุ่มที่มีอาการน้อยและกลุ่มที่ไม่มีอาการแทรกซ้อน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .005$ และ $P < .0001$ ตามลำดับ) ส่วนกลุ่มที่มีอาการน้อย มีค่าเฉลี่ย OD ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่มีอาการ ($P > .05$)

ในกลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนมาก คนไข้บางรายได้รับการเจาะเลือดมากกว่า 1 ครั้ง การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย OD ของ ACAs ระหว่างกลุ่ม จึงนำผลจาก specimen แรกที่เจาะของคนไข้แต่ละรายมาเปรียบเทียบกัน พบว่า กลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนมาก จะมีความแตกต่างกับกลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนน้อย และกลุ่มที่ไม่มีอาการ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .01$ และ $P < .0025$ ตามลำดับ) ส่วนกลุ่มที่มีอาการน้อย ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่มีอาการ (รูปที่ 12) ผู้ป่วย $6/25$ ราย ในกลุ่มที่มีอาการแทรกซ้อนอย่างรุนแรง มี fluctuation ในระดับของ ACAs ที่ตรวจพบตามระยะเวลาต่าง ๆ ของการป่วย แสดงไว้ในรูปที่ 13 และ ACAs สามารถตรวจพบได้ถึงเวลามากกว่า 10 วันที่มีอาการป่วย (รูปที่ 14)

คนไข้มีอาการแทรกซ้อนจาก Semple vaccine ทั้ง 2 กลุ่ม จำนวน 46 ราย ที่ให้ผลบวก ACAs 18 ราย สามารถตรวจพบ isotypes ได้หลายแบบคือ เป็น IgG ชนิดเดี่ยว 6 ราย IgG และ IgM 1 ราย และพบทั้ง 3 isotype 11 ราย

3.3 ผลการศึกษา ACAs ในคนไข้โรคทางระบบประสาทอื่น (ตาราง 7)

คนไข้โรคทางระบบประสาทที่มี Immunopathogenic basis จำนวน 43 ราย ให้ผลบวก 10 ราย (23.5%) ส่วน CNS infection ให้ผลบวก 4 จาก 31 ราย (12.9%) Degenerative disease ให้ผลบวก 5 จาก 22 ราย (22.7%) และกลุ่ม Miscellaneous ให้ผลบวกเพียง 2 จาก 31 ราย (6.45%) (รูปที่ 15 และ 16)

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย OD พบว่า กลุ่มที่มี Immunopathogenic basis มีความแตกต่างกับกลุ่ม CNS infection อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .01$) แต่มิแตกต่างกับกลุ่มที่เป็น Degenerative disease

4. ผลการศึกษาคความแม่นยำ (Precision) และความเชื่อถือได้ (Reproducibility) ของการทดสอบ

ผลการศึกษาคความแม่นยำ (Precision) ให้ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (%CV) 5.5-6.3% และความเชื่อถือได้ (Reproducibility) ของการทดสอบให้ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (%CV) 8.1-11.9% ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8 และตารางที่ 9

5. ผลการศึกษาคความจำเพาะของการทดสอบ (Specificity)

5.1 ผลการทำ Inhibition test: พบว่าซีรัมซึ่งอบกับ cardiolipin ก่อนจะให้ผล ACA ลดลงต่ำกว่าซีรัมซึ่งอบกับ alcohol อย่างชัดเจน โดยแสดง inhibition มากกว่า 50% แสดงไว้ใน รูปที่ 17

5.2 ผลการตรวจผู้ป่วย multiple myeloma ให้ค่า OD ในการตรวจหา ACAs ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในคนปกติ (0.264) ทุกรายให้ค่า OD ระหว่าง 0.180-0.251

II. ผลการทำ VDRL โดยวิธี ELISA

1. ผลการทำ Checkerboard titration (รูปที่ 18)

1.1 ซีรัมทั้ง 3 ชนิดคือ VDRL non-reactive, reactive 1:1 และ 1:16 ส่วนใหญ่ให้ค่า OD สูงค่าตามความเข้มข้นของแอนติเจน และความแตกต่างเหล่านี้จะชัดเจนในซีรัมที่ VDRL reactive titer สูงๆ ที่แอนติเจนความเข้มข้น 1:2 และที่นำได้เจือจางลง ให้ OD ของซีรัม VDRL reactive 1:16 สูง และแยกระหว่าง non-reactive, reactive 1:1 และ reactive 1:16 ได้ชัดเจนทั้ง 2 ความเข้มข้น แต่ในการทดสอบเลือกใช้แอนติเจนที่เจือจาง 1:55 เพื่อให้ปริมาณ cardiolipin ใน VDRL Ag. ใกล้เคียงกับปริมาณ cardiolipin ในการตรวจ ACAs คือ 2.7 ไมโครกรัม/หลุม

1.2 แอโรเซินต์ adult bovine serum ที่ใช้น้องกัน non-specific binding นั้น แม้ว่า 10% ABS-PBS จะให้ OD กับ normal serum ต่ำกว่า 5% ABS-PBS มาก และความแตกต่างระหว่าง normal serum และซีรัมที่ VDRL reactive 1:1 ชัดเจนกว่าเมื่อใช้ 5% ABS-PBS เลือกใช้ 5% ABS-PBS ในการทดสอบต่อไป

1.3 ความเข้มข้นของ peroxidase conjugated antihuman IgG, หรือ IgM ที่ 1:800 และ 1:1000 แม้ว่า 1:800 จะให้ OD สูงกว่า แต่ความแตกต่างระหว่าง serum ทั้ง 3 ระดับคงให้ความแตกต่างชัดเจนใกล้เคียงกัน เลือกใช้ dilution 1:1000 ในการทดสอบต่อไป

2. ผลการตรวจ VDRL โดยวิธี ELISA และ ACAs

ในคนไข้ syphilis 20 ราย และคนไข้ SLE (ACAs positive) 15 ราย

ทั้ง IgG และ IgM isotype (แสดงในรูปที่ 19 และ 20) พบว่า ซีรัมคนไข้ syphilis ส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับ VDRL-Ag. และ cardiolipin เมื่อเปรียบเทียบ binding activity ของซีรัมผู้ป่วย syphilis ต่อ VDRL-Ag และ cardiolipin พบว่า ซีรัมผู้ป่วย syphilis ส่วนใหญ่จะจับกับ VDRL-Ag ได้ดีกว่า cardiolipin โดยเฉพาะ IgM isotype ซึ่งค่าเฉลี่ย binding activity ต่อ VDRL-Ag. สูงกว่าค่าเฉลี่ย binding activity ต่อ cardiolipin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .001$)

ส่วนซีรัมของผู้ป่วย SLE (ACAs positive) 15 ราย (IgG) จะทำปฏิกิริยากับ cardiolipin ได้ดีกว่า VDRL-Ag. พบว่าค่าเฉลี่ย binding activity ต่อ cardiolipin (IgG) สูงกว่า binding activity ต่อ VDRL-Ag. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .0001$)

รูปที่ 8 ผลการทำ Checkerboard titration สำหรับ ACAs (แสดงผลเป็นค่า O.D.)

Cardiolipin	45 µg/ml					90 µg/ml						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A - B	0.299	0.238	0.190	0.235	0.201	0.161	0.313	0.322	0.239	0.225	0.211	0.158
C - D	0.874	0.676	0.542	0.704	0.584	0.372	0.860	0.786	0.489	0.731	0.547	0.389
E - F	0.285	0.258	0.209	0.249	0.209	0.163	0.278	0.288	0.285	0.338	0.209	0.187
G - H	0.938	0.732	0.588	0.680	0.668	0.427	0.931	0.809	0.532	0.764	0.520	0.435

Conjugate dilution →	1:	500	1000	1500	500	1000	1500	500	1000	1500	500	1000	1500
Serum dilution →		1:50			1:100			1:50			1:100		

N = normal serum. P = positive serum

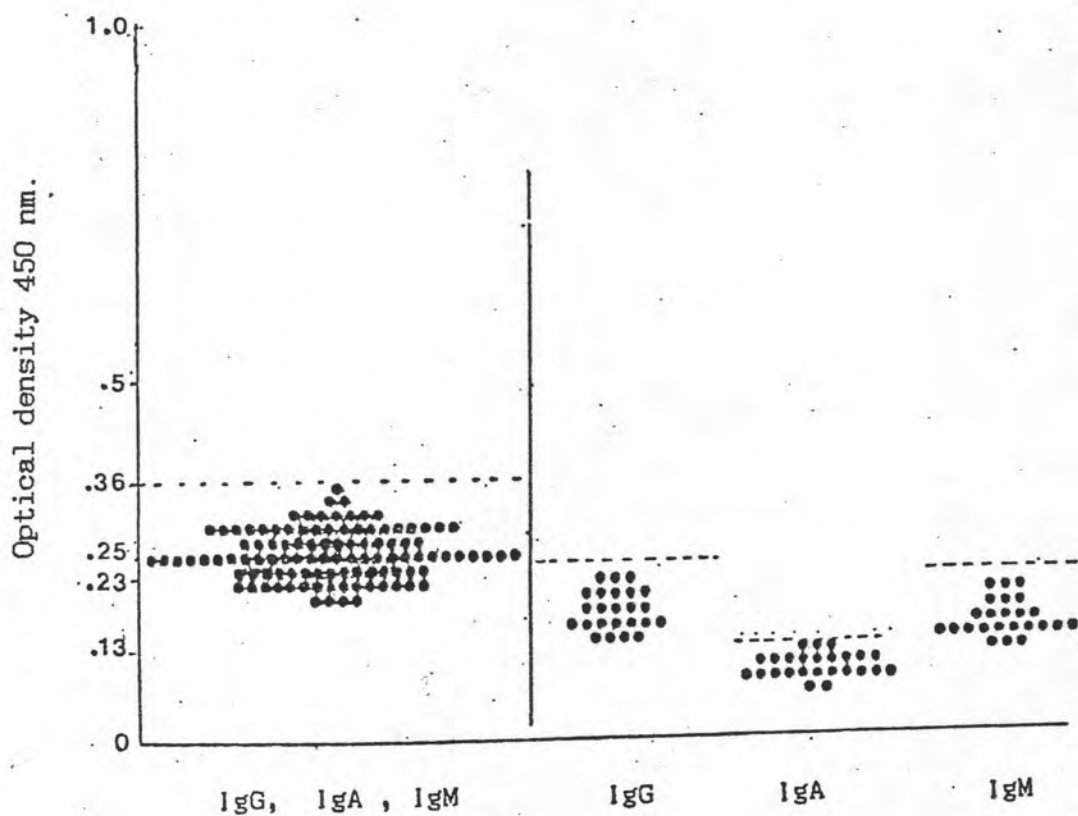
ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนการทำ ELISA เพื่อตรวจหา ACAs

ขั้นตอนดำเนินการ	กัวทาลาย	ความเข้มข้น	ปริมาณ มล/หลุม	เวลา ชั่วโมง	อุณหภูมิ
1. เคลือบหลุมด้วย CL	Absolute ethanol	45 ug/ml	60	18-24	4 °C
2. ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.4	-	-	200	-	RT
3. เติม 5% ABS-PBS	-	-	150	1 hr	RT
4. ล้าง 1 ครั้ง ด้วย PBS	-	-	200	-	-
5. เติมซีรัมเจือจาง 1:50	5% ABS-PBS	-	100	3 hr	RT
6. ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS	-	-	200	-	-
7. เติม conjugate	5% ABS-PBS	1:1000 1:500	100	1.5 hr	RT
8. ล้าง 4 ครั้งด้วย PBS	-	-	200	-	-
9. เติม substrate (OPD)	citrate buffer pH 5	0.25 mg/ml	100	0.5 hr	RT
10. อ่าน OD ที่ 450 nm					

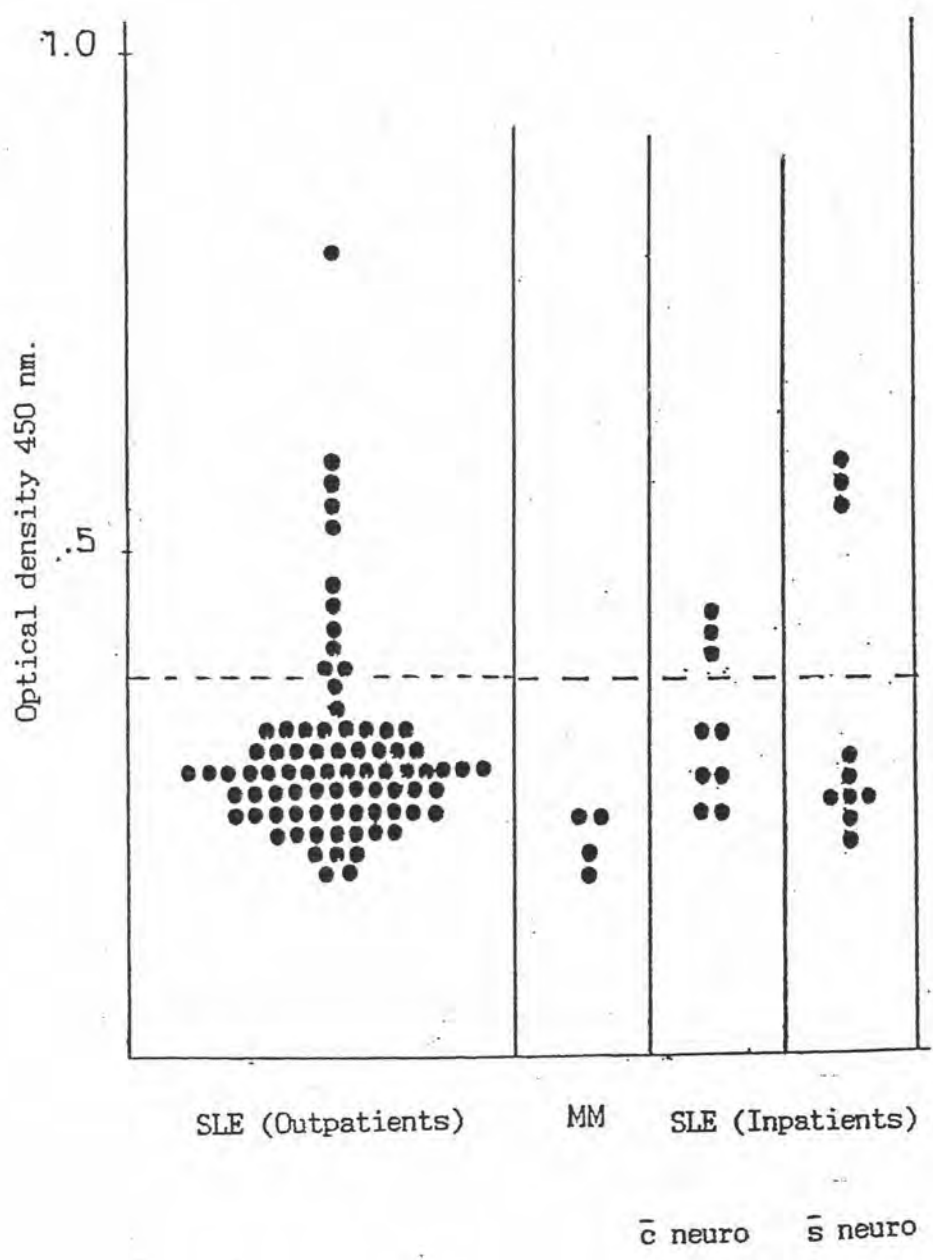
ตารางที่ 6 แสดงค่า O.D. การตรวจ ACAs (polyvalent) และ ACA แต่ละ isotype
ในคนปกติ

ACAs	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าปกติ ($\bar{x}+3SD$)
IgG, IgA, IgM	111	0.264	0.031	<0.368
IgG	24	0.176	0.025	<0.251
IgA	24	0.087	0.013	<0.126
IgM	24	0.153	0.026	<0.231

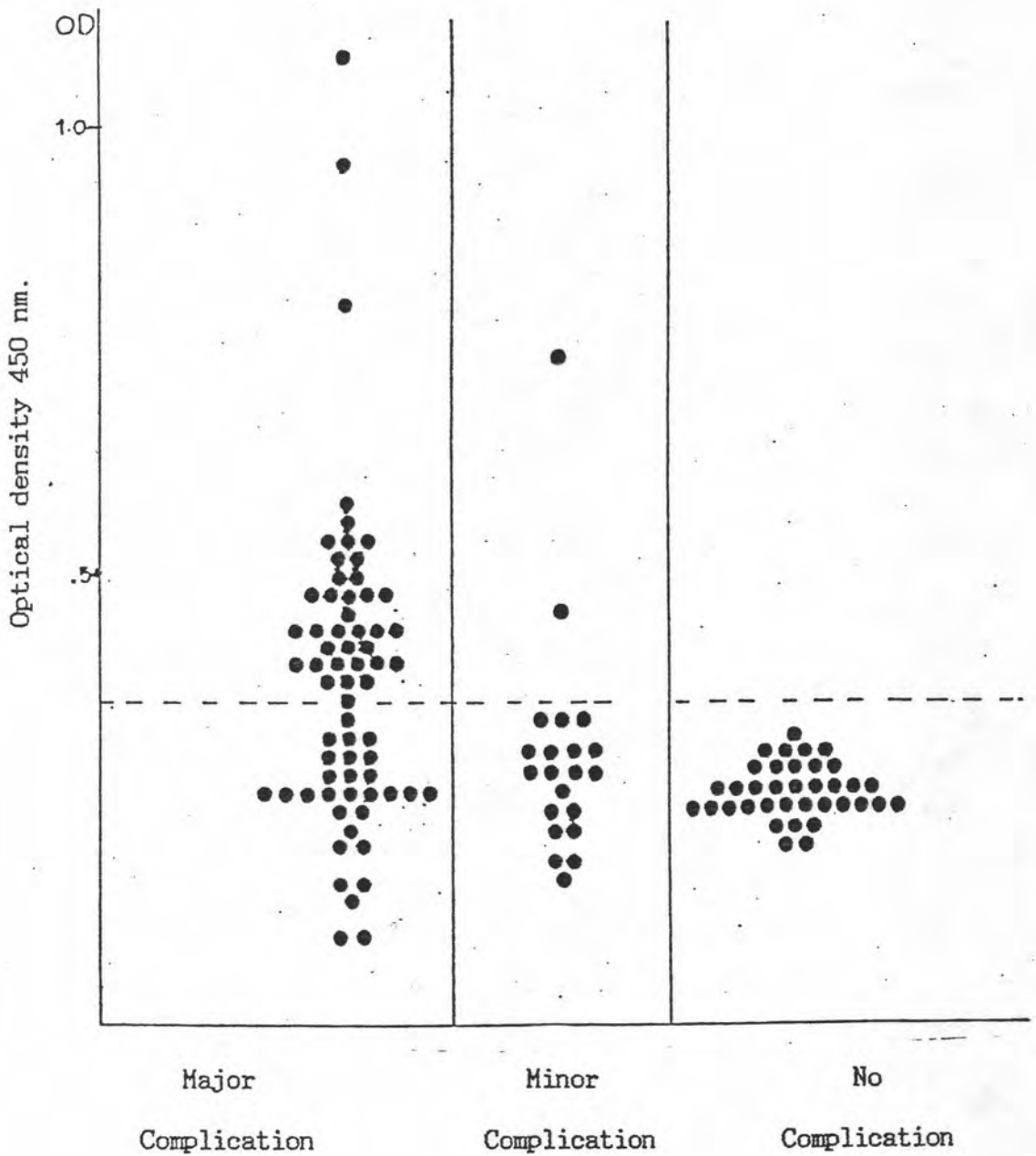
รูปที่ 9 binding activity ของซีรัมคนปกติต่อ cardiolipin ทั้ง IgG IgA IgM (polyvalent) ของผู้บริจาคโลหิต 111 ราย และแยก isotype ของผู้บริจาคโลหิต 24 ราย (.....) แสดงถึง cut off level



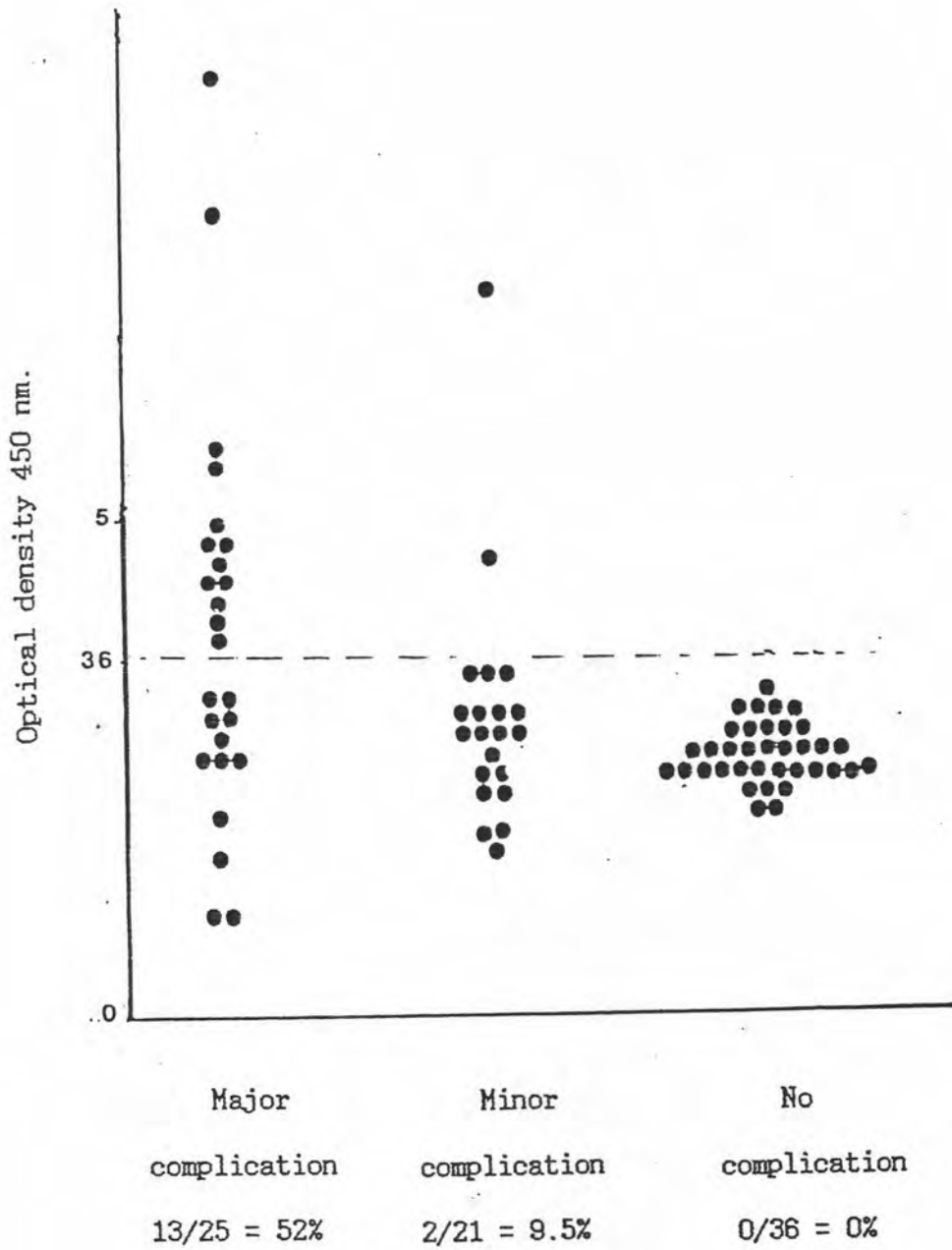
รูปที่ 10 แสดง biding activity ของ serum ผู้ป่วย SLE กลุ่มที่มีอาการน้อย และกลุ่มที่มีอาการมาก ทั้งที่มีอาการทางระบบประสาท (c neuro) และไม่มีอาการทางระบบประสาท (s neuro) เส้นประ(....) แสดงถึง cut off level MM (Multiple myeloma) เป็นกลุ่มควบคุม ที่แสดง Specificity



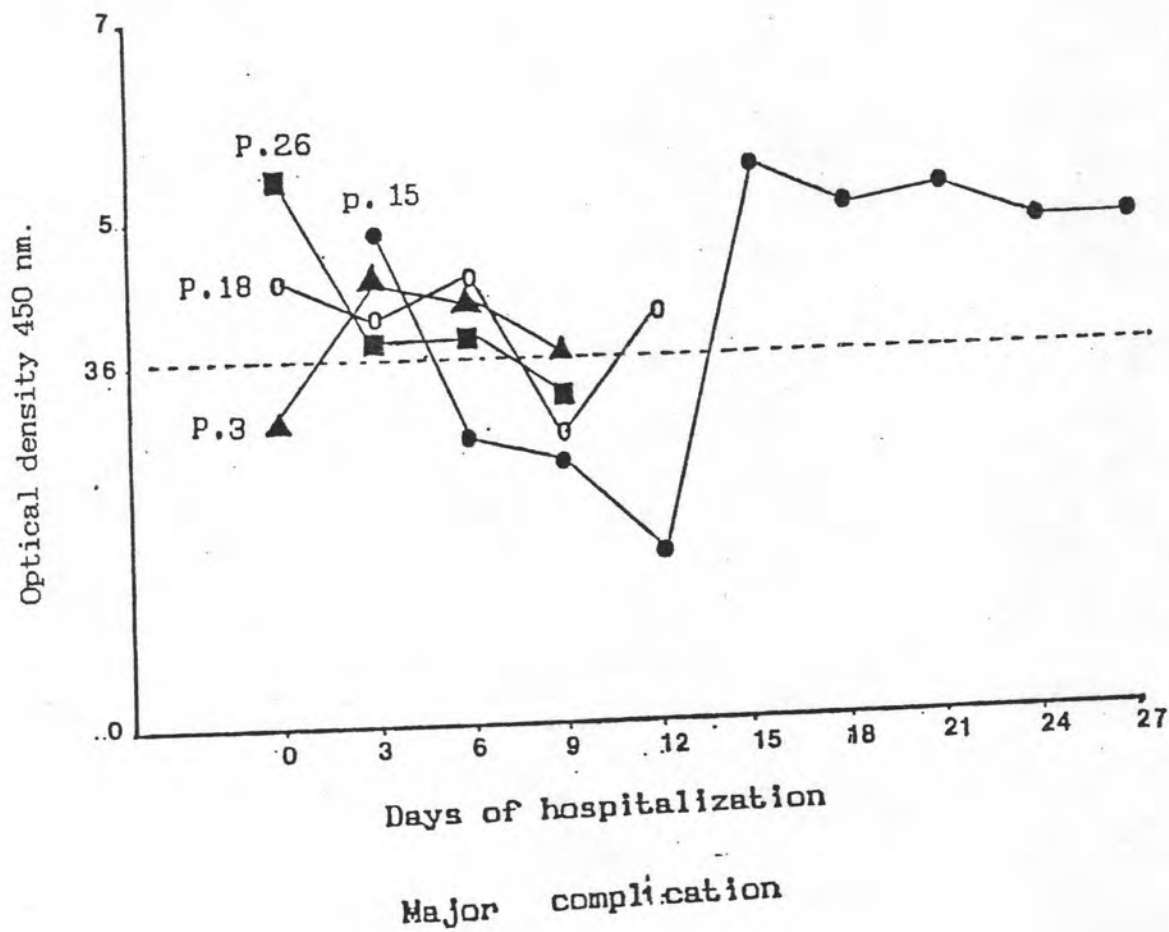
รูปที่ 11 แสดง binding activity ของ serum ผู้ป่วยแพ้ Semple vaccine
กลุ่มต่าง ๆ ต่อ cardiolipin (IgG, IgA, IgM)



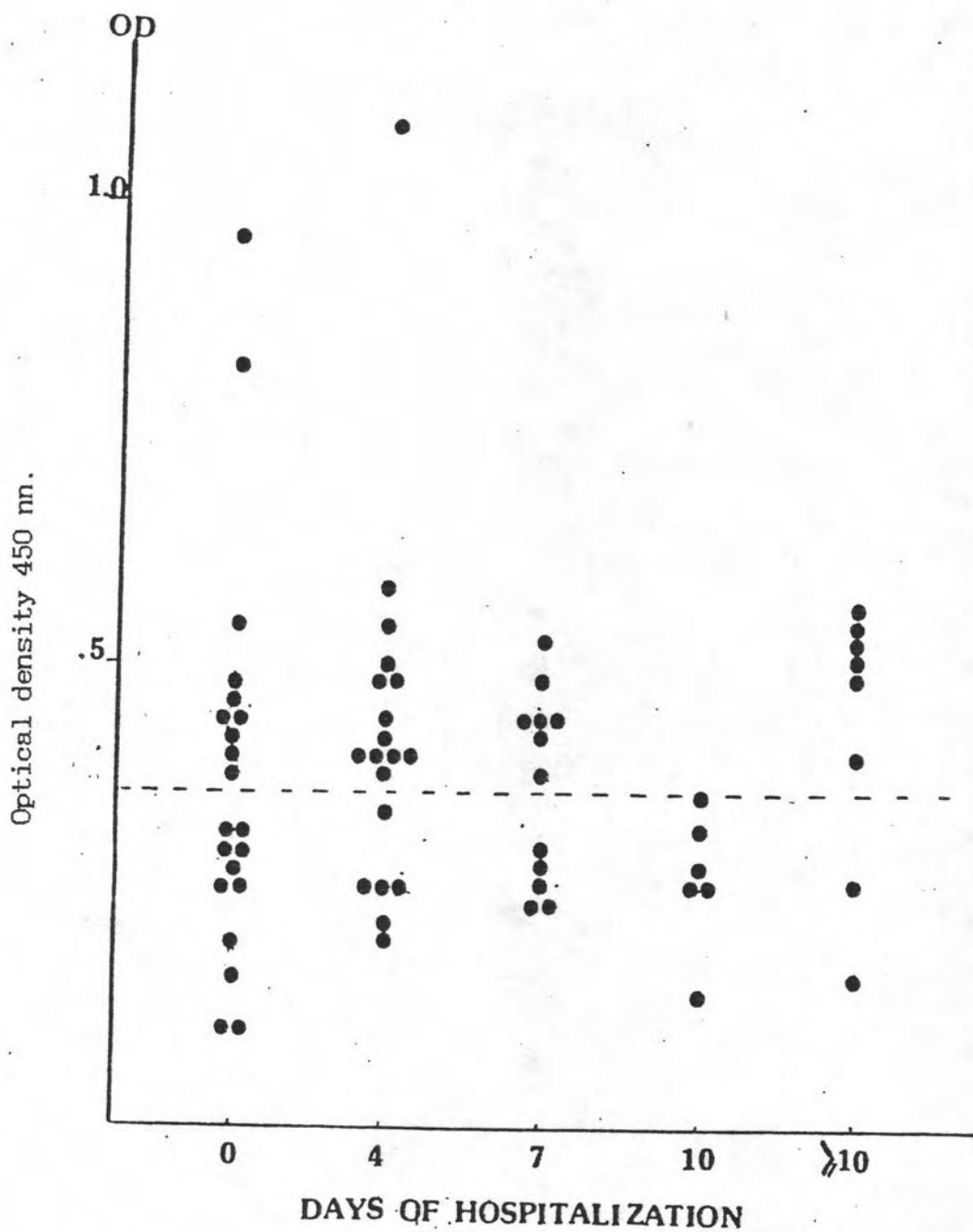
รูปที่ 12 แสดง binding activity ของ serum ผู้ป่วยแพ้ Sempole vaccine (คนละ 1 specimen) กลุ่มต่าง ๆ ต่อ cardiolipin (IgG, IgA, IgM)



รูปที่ 13 แสดง binding activity ของ serum ผู้ป่วยไข้ Sempole vaccine
 กับ cardiolipin (IgG, IgA, IgM) (4 ราย P.3,15,18,26) ซึ่งเปลี่ยน
 แปลงในแต่ละครั้งที่เจาะเลือด



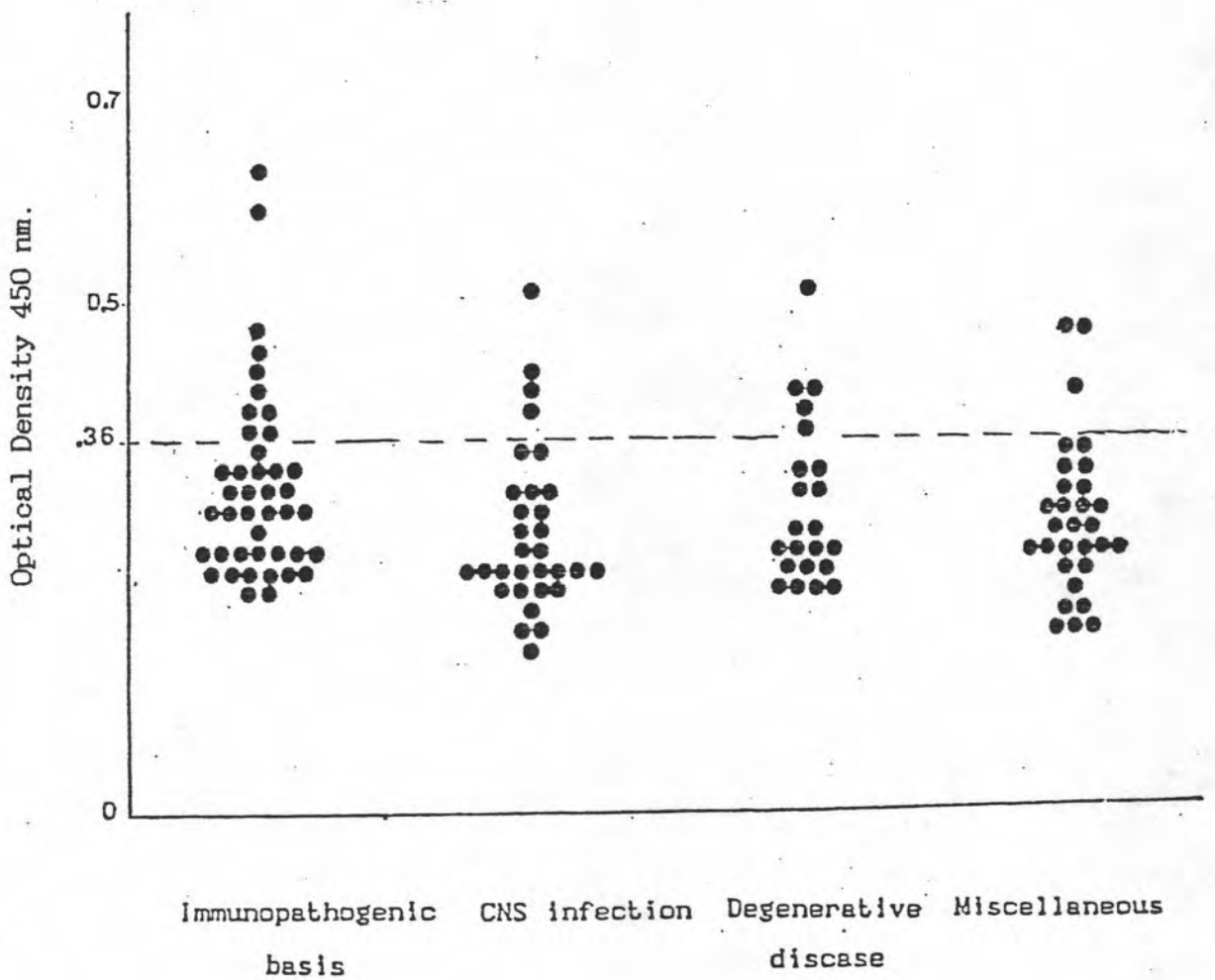
รูปที่ 14 แสดงระดับของ ACAs ในกลุ่ม major complication ที่ตรวจพบในช่วงระยะเวลา
ที่คนไข้กำลังป่วย เส้นประ (.....) แสดงถึง cut off level



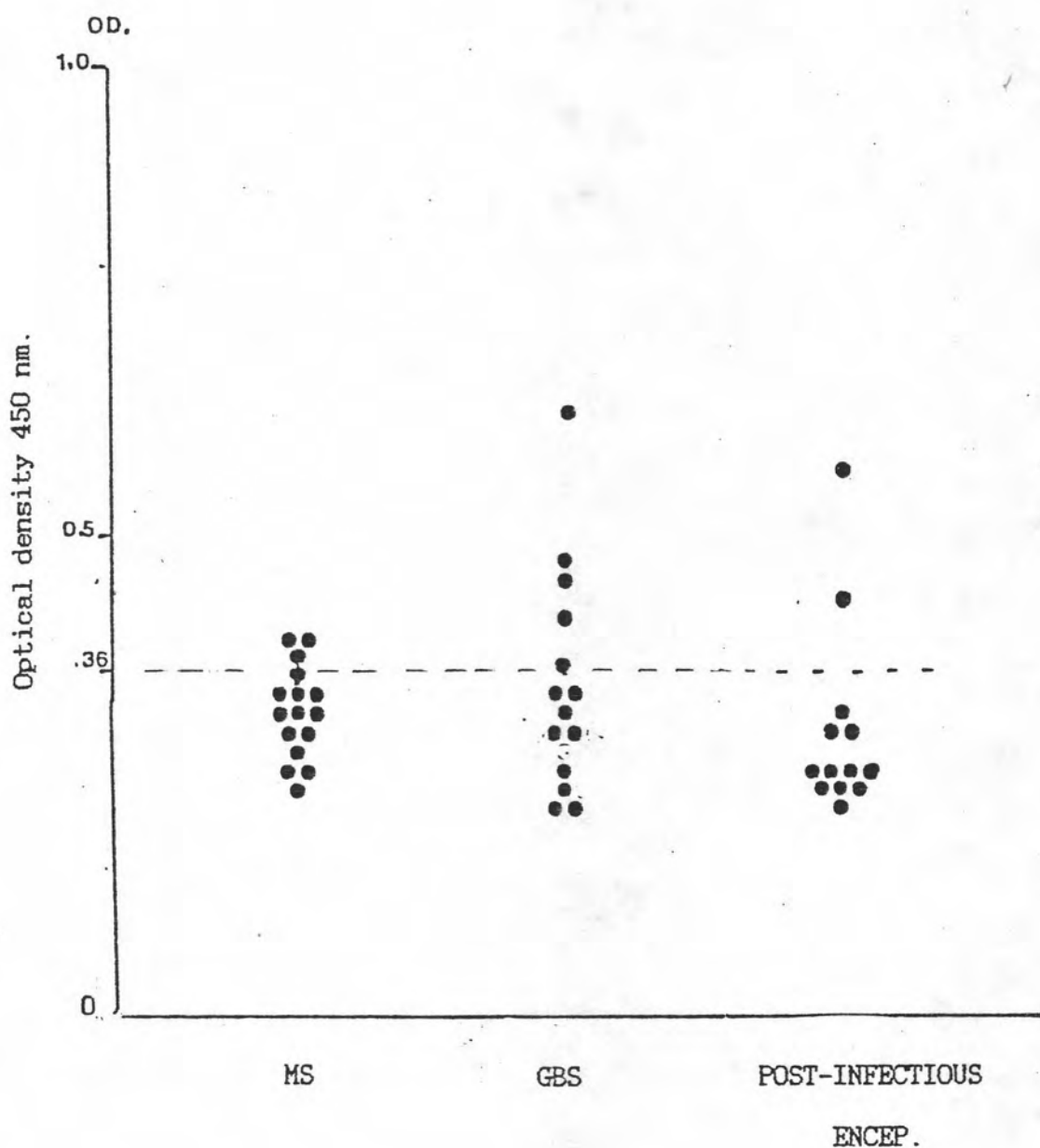
ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจพบ ACAs ในคนไข้โรคต่าง ๆ ทางระบบประสาท กลุ่มต่าง ๆ และรายละเอียดชื่อโรคในแต่ละกลุ่มที่นำมาศึกษา พร้อมทั้ง Isotype ที่ตรวจพบ

กลุ่มคนไข้	จำนวนคนที่ให้ผลบวก/ จำนวนคนที่ตรวจ	Isotype	จำนวนคน
Immunopathogenic basis	10/43		
Post-infectious encephalitis	2/13	IgG, IgA	1
		IgG, IgA, IgM	1
Guillain-Barre syndrome	5/14	IgG	1
		IgG, IgA, IgM	3
		ND	1
Multiple sclerosis	3/16	IgG	2
		ND	1
CNS infection	4/31		
Bacteria	0/2	-	-
T.B.	2/7	IgG	1
		IgG, IgA, IgM	1
Virus	2/14	IgG, IgM	1
		IgG, IgA, IgM	1
Fungus	0/2	-	-
Parasites	0/6	-	-
Degenerative disease	5/22		
Progressive spastic paraplegia	2/8	IgG	2
Multisystem degenerative disease	0/1	-	-
Corpuscullosum degenerative	0/1	-	-
Muscular dystrophy	3/12	IgG	3
Miscellaneous	2/31		
Paraneoplastic syndrome	0/2	-	-
Nutritional polyneuropathy	0/2	-	-
Post-encephalitis sequelae	0/2	-	-
Vascular disease (stroke) unknown cause	1/8	IgG, IgM	1
Vasculitis	0/3	-	-
Pseudotumor cerebral	0/1	-	-
Acute transverse myelopathy	0/2	-	-
Tissue culture rabies vaccine complications	1/9	IgG, IgA, IgM	1
Brain tumor	0/1	-	-

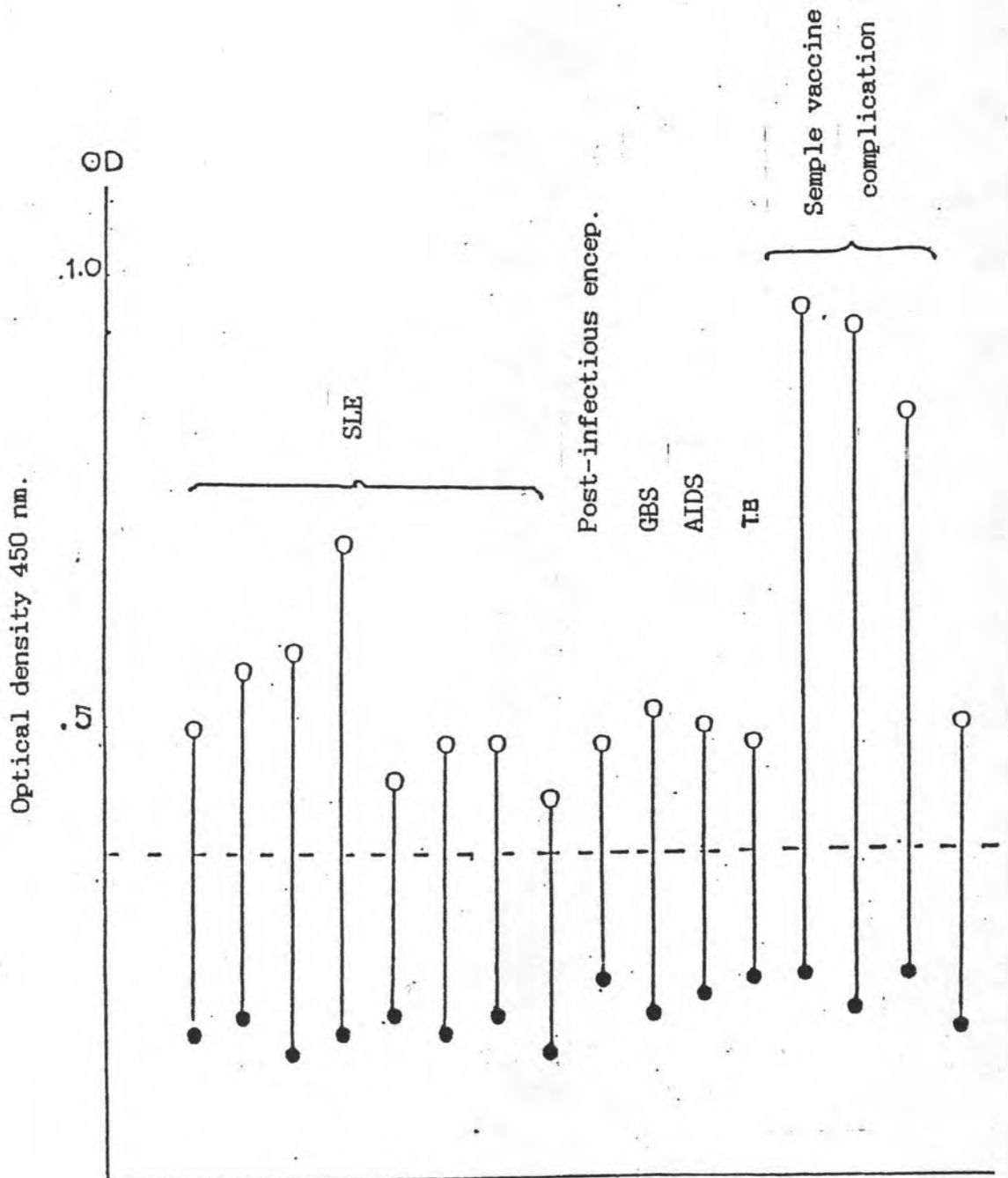
รูปที่ 15 แสดง binding activity ของ serum คนไข้โรคต่าง ๆ ทางระบบประสาทต่อ cardiolipin (IgG, IgA, IgM) เส้นประ (.....) แสดงถึง cut off level



รูปที่ 16 แสดง binding activity serum คนไข้ ในกลุ่ม Immunopathogenic basis ได้แก่ โรคต่าง ๆ คือ GBS, Multiple sclerosis และ Post-infectious encephalitis เส้นประ (.....) แสดงถึง cut off level



รูปที่ 17 แสดงค่า OD ของ serum ซึ่งอภัย cardiolipin (●) และ serum ซึ่งอภัย alcohol (○) ●---○ หมายถึง serum จากคนไข้คนเดียวกัน



ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงตรงของการทดสอบ (Precision)

%CV ของ normal pool = 5.50%

%CV ของ pool II = 6.30%

%CV ของ pool III = 6.02%

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาความเชื่อถือได้ของการทดสอบ (Reproducibility)

%CV ของ normal pool = 11.90%

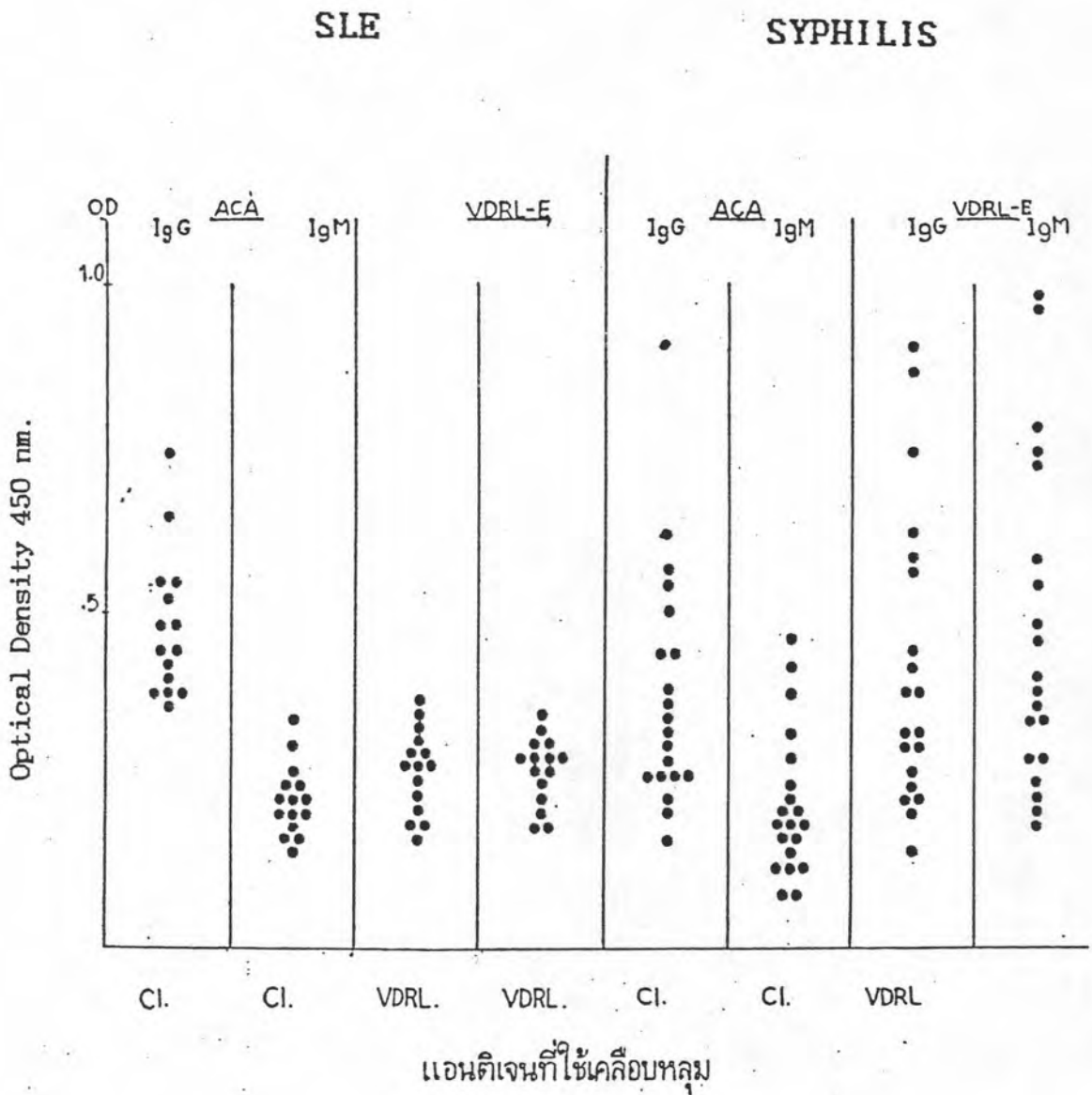
%CV ของ pool II = 8.10%

%CV ของ pool III = 8.43%

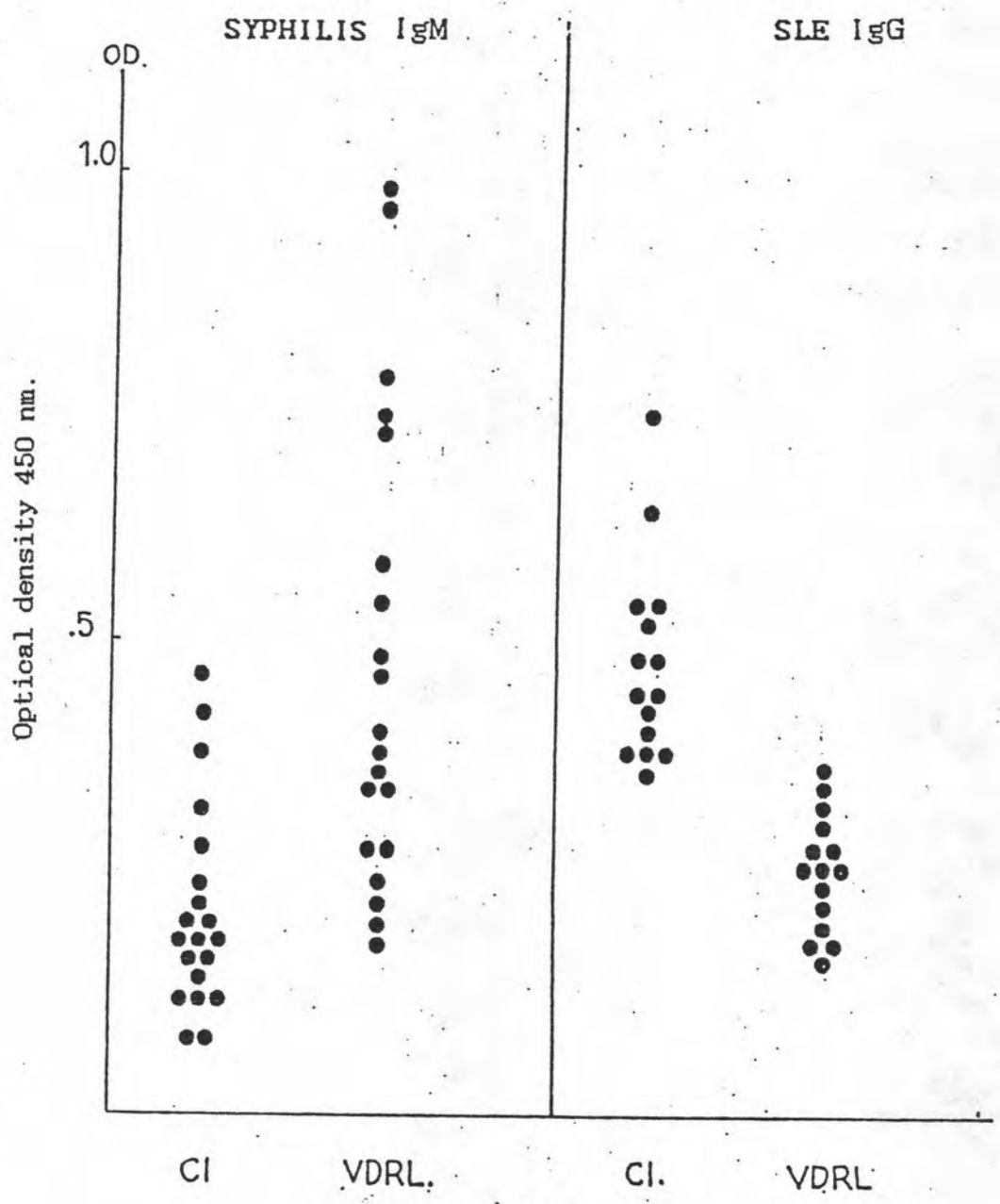
รูปที่ 18 ผลการทดสอบ Checkerboard titration ของ VDRL-ELISA

VDRL Ag. dilution	5% ABS-PBS												VDRL titer	
	10% ABS-PBS				1:1				1:16					
1:1	NP	1:1	1:6	NP	1:1	1:16	NP	1:1	1:16	NP	1:1	1:16	1:16	
	0.190	0.275	0.778	0.166	0.228	0.686	0.282	0.370	0.988	0.257	0.354	0.882		
1:2	NP	1:1	1:6	NP	1:1	1:16	NP	1:1	1:16	NP	1:1	1:16	1:16	
	0.167	0.257	0.683	0.147	0.225	0.635	0.252	0.399	0.910	0.233	0.353	0.864		
1:1	NP	1:1	1:6	NP	1:1	1:16	NP	1:1	1:16	NP	1:1	1:16	1:16	
	0.172	0.267	0.624	0.160	0.252	0.559	0.253	0.331	0.873	0.224	0.314	0.755		
1:2	NP	1:1	1:6	NP	1:1	1:16	NP	1:1	1:16	NP	1:1	1:16	1:16	
	0.178	0.298	0.606	0.147	0.244	0.490	0.233	0.310	0.810	0.206	0.337	0.653		
	1:800	1:1000				1:800	1:1000				1:1000	1:1000		Conjugate dilution

รูปที่ 19 แสดง binding activity ต่อ cardiolipin ของผู้ป่วย SLE ซึ่ง ACAs positive TPHA และ FTA-ABS negative 15 ราย และผู้ป่วย syphilis ซึ่ง TPHA และ FTA-ABS positive 20 ราย ทั้ง IgM และ IgG isotype



รูปที่ 20 เปรียบเทียบผลการตรวจ VERL-E และ ACA (IgM) ในผู้ป่วย Syphilis กับ VDRL-E และ ACA IgG ในผู้ป่วย SLE



แอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุม