

การทดสอบทางภูมิคุ้มกันอาจแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การตรวจที่เน้นการตอบสนองทาง humoral immune response หรือการตรวจทางน้ำเหลือง (serological test) อีกส่วนจะเป็นการตรวจการทำงานของระบบ cellular immune response หรือการตรวจสอบ lymphocyte function test โดยเนื้อในที่นี้จะเน้นการตรวจที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีระดับพื้นฐานเป็นหลัก

การตรวจทางน้ำเหลือง (serology test)

การตรวจสอบทาง serological test เป็นการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยอาศัยสมบัติความจำเพาะต่อกันของแอนติเจนและแอนติบอดี การเกิดปฏิกิริยาอาศัยพันธะ non-covalent bonds และเป็นปฏิกิริยาผันกลับได้ โดยรายละเอียดสามารถศึกษาเพิ่มเติมได้ในบทเรียนเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน แรงเหล่านี้จะทำให้เกิดการจับกันระหว่างส่วน Fab ของแอนติบอดีจับกับ epitope ของแอนติเจน แรงที่จับกันของ 1 Fab กับ 1 epitope ของแอนติเจน เรียกว่า affinity โดยทั่วไปแอนติเจน 1 โมเลกุลจะมี ตั้งแต่ 2 Fab ขึ้นไปแล้วแต่ชนิดของแอนติบอดี ส่วนแรงรวมทั้งโมเลกุลที่เกิดจากหลาย Fab จะเรียกว่า avidity

ปฏิกิริยาจำเพาะและปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (specificity and cross reactivity)

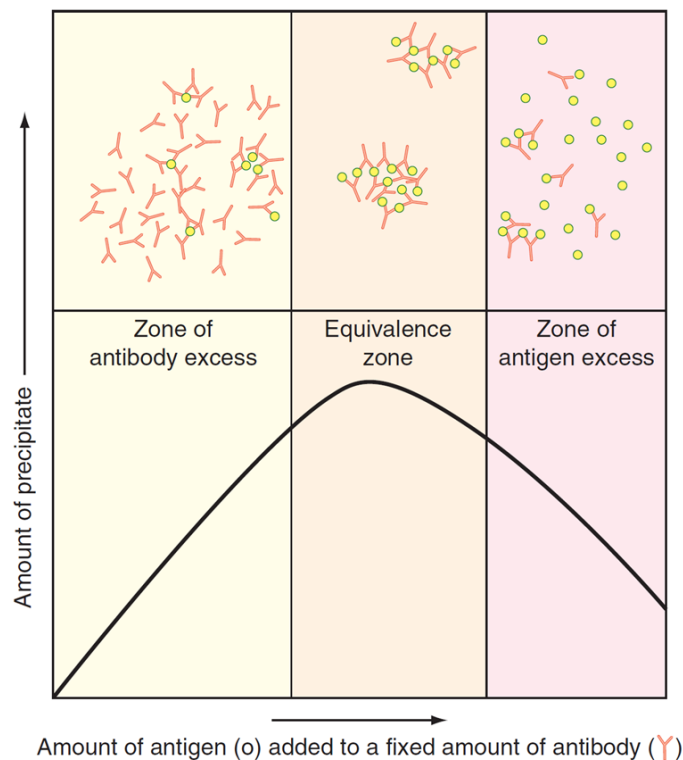
การตรวจทางภูมิคุ้มกันอาศัยสมบัติของปฏิกิริยาจำเพาะเป็นหลัก ซึ่งหมายถึงแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะต่อแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองนั้น แต่ในบางกรณีแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดหนึ่งสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนอีกชนิดหนึ่งได้ เรียกว่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม เช่น การฉีดวัคซีนป้องกันโรคฝีดาษ สามารถทำได้โดยใช้เชื้อไวรัส vaccinia ที่ทำให้เกิดโรค cowpox ในวัวเพื่อกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติข้ามกลุ่มกับเชื้อฝีดาษในมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาข้ามกลุ่มอาจส่งผลกระทบทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) หรือผลลบปลอม (false negative) ในการตรวจทางระบบทางภูมิคุ้มกันได้

การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน

สามารถทำได้หลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับคุณลักษณะของแอนติบอดี แอนติเจน หรือสารที่ใช้ร่วมกับปฏิกิริยา โดยการทดสอบแต่ละวิธีจะมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่ต่างกัน นอกจากนี้บางการทดสอบอาจให้ผลในเชิงปริมาณ คือสามารถบอกปริมาณของสารเป็นค่าได้อย่างชัดเจน หรือเชิงกึ่งปริมาณ หรือเชิงคุณภาพ คือสามารถบอกได้ว่ามีหรือไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น

ปฏิกิริยาตกตะกอน (precipitation method)

เมื่อนำแอนติเจนที่ถูกละลายอยู่ในตัวละลายทำให้อยู่ในสถานะเป็นสารละลาย มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะในอัตราส่วนที่พอเหมาะ จะสามารถเกิดปฏิกิริยาทำให้แอนติเจนและแอนติบอดีจับกันเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (lattice formation) จนไม่สามารถละลายตัวอยู่ได้ในสารละลาย ทำให้ตกตะกอนลงมาจนเห็นได้ด้วยตาเปล่า ปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีต้องพอดีขึ้น โดยเรียกสัดส่วนดังกล่าวว่า equivalence zone หากมีแอนติบอดีมากเกินไปอาจจะเรียกว่า prozone หรือ antibody excess ส่วนหากแอนติเจนมากเกินไปเรียกว่า postzone หรือ antigen excess



(ที่มา Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 23rd ed.)

การเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนสามารถเกิดได้ทั้งในของเหลวหรือตัวกลางที่เป็นสารกึ่งของเหลวเช่นสารที่มีลักษณะคล้ายวุ้น (gel) ซึ่งจะได้กล่าวถึงในรายละเอียดต่อไป

ปฏิกิริยาการตกตะกอนสามารถแบ่งอย่างละเอียดเป็น 2 ขั้นตอน คือ primary antigen-antibody reaction ซึ่งไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และ secondary antigen-antibody reaction คือ ปฏิกิริยาที่ต้องใช้เวลาเป็นนาที่หรือชั่วโมงเพื่อให้แอนติเจนกับแอนติบอดี โดยมีการเชื่อมโยงกันเป็นร่างแห (lattice formation) เกิดตกตะกอนกลุ่มก้อนใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ในปัจจุบันนอกเหนือจากการสังเกตการตกตะกอนด้วยตาเปล่า ยังสามารถทำได้ในกรณีที่ไมเกิดปฏิกิริยาที่ไม่เห็นชัดเจน สามารถตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ เช่นการใช้การวัดความขุ่นโดยอาศัยการดูดกลืนแสง (absorb) ของสารโดยใช้เครื่อง turbidimetry หรือการใช้เครื่อง nephelometry วัดการกระจายของแสง (light scattering) ของสาร

ปฏิกิริยาการตกตะกอนในตัวกลางกึ่งของเหลว

เนื่องจากแอนติเจนและแอนติบอดีมีคุณสมบัติเป็นสารละลายที่สามารถแพร่กระจายในตัวกลางกึ่งของเหลว (semisolid) เช่น agar

1. Two-dimensional double diffusion หรือ Ouchterlony

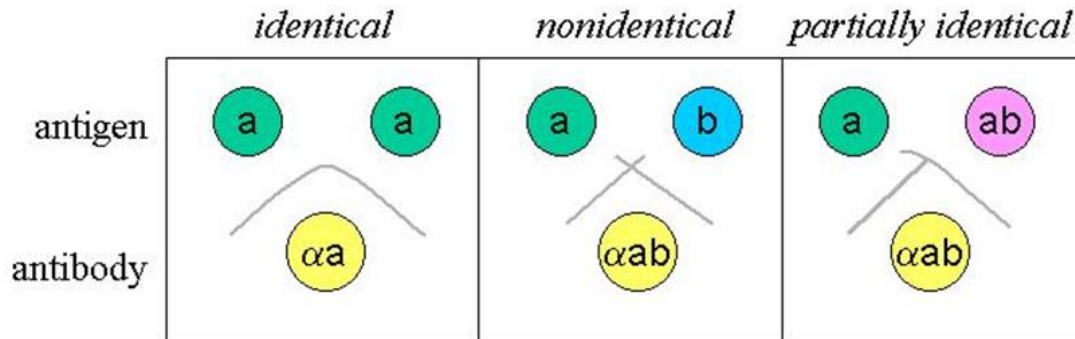
แอนติเจนและแอนติบอดีสามารถเคลื่อนที่แพร่กระจายในวุ้นจากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่บริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ เมื่อแอนติเจนแพร่กระจายและไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่แพร่กระจายมาพบกันจะเกิดปฏิกิริยาขึ้น บริเวณที่เป็น equivalence zone จะเกิดตะกอนเป็นเส้นสีขาวในวุ้น เนื่องจากมีอาศัยการแพร่กระจายทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีจึงเรียกว่า double diffusion วิธีนี้ถูกพัฒนาโดย Örjan Ouchterlony

โดยเส้นที่เห็นแต่ละเส้นจะแสดงถึงการเกิด antigen-antibody อย่างน้อย 1 คู่ เราสามารถนำมาหาชนิดของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกันได้

แบบที่ 1 identity หมายถึง แอนติเจนในหลุมที่ 1 เหมือนกันกับแอนติเจนในหลุมที่ 2 จะเห็นเส้นตะกอนโค้งเข้าหากันและต่อกันสนิท

แบบที่ 2 Partial identity หมายถึง แอนติเจนในหลุมที่ 1 กับหลุมที่ 2 มีบางส่วนที่เหมือน และบางส่วนที่ต่างกัน เส้นตะกอนที่เกิดขึ้นจะมีส่วนหนึ่งต่อกันสนิท และอีกส่วนหนึ่งยื่นยาวออกไปเรียกว่า spur

แบบที่ 3 Non-identity หมายถึง แอนติเจนกลุ่มที่ 1 และแอนติเจนกลุ่มที่ 2 ไม่เหมือนกันเลย จะพบลักษณะของเส้นตะกอนที่ตัดกัน



(ที่มา www.life.umd.edu)

Single radial immunodiffusion (SRID)

เป็นปฏิกิริยาการตกตะกอนที่เกิดโดยให้แอนติเจนเป็นตัวแพร่กระจายไปในวุ้นที่ผสมด้วยแอนติบอดีในความเข้มข้นระดับหนึ่ง โดยเจาะรูวุ้นเพื่อหยดแอนติเจนลงไป แอนติเจนจะกระจายออกทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ผสมในวุ้นเกิดเส้นตะกอนเป็นวงกลม (precipitin ring) ให้ความเข้มข้นของแอนติเจนจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นตะกอน วิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นของแอนติเจนได้โดยการใช้สำยามาตรฐานที่รู้ปริมาณแอนติเจนที่แน่นอนและมีปริมาณต่างกันอย่างน้อย 3 ระดับ นำมาเขียนเป็นเส้นกราฟเพื่อใช้เปรียบเทียบกับตัวอย่างตรวจแล้วคำนวณหาความเข้มข้นของแอนติเจนในตัวอย่างได้ วิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจหา complement และ immunoglobulin เป็นต้น

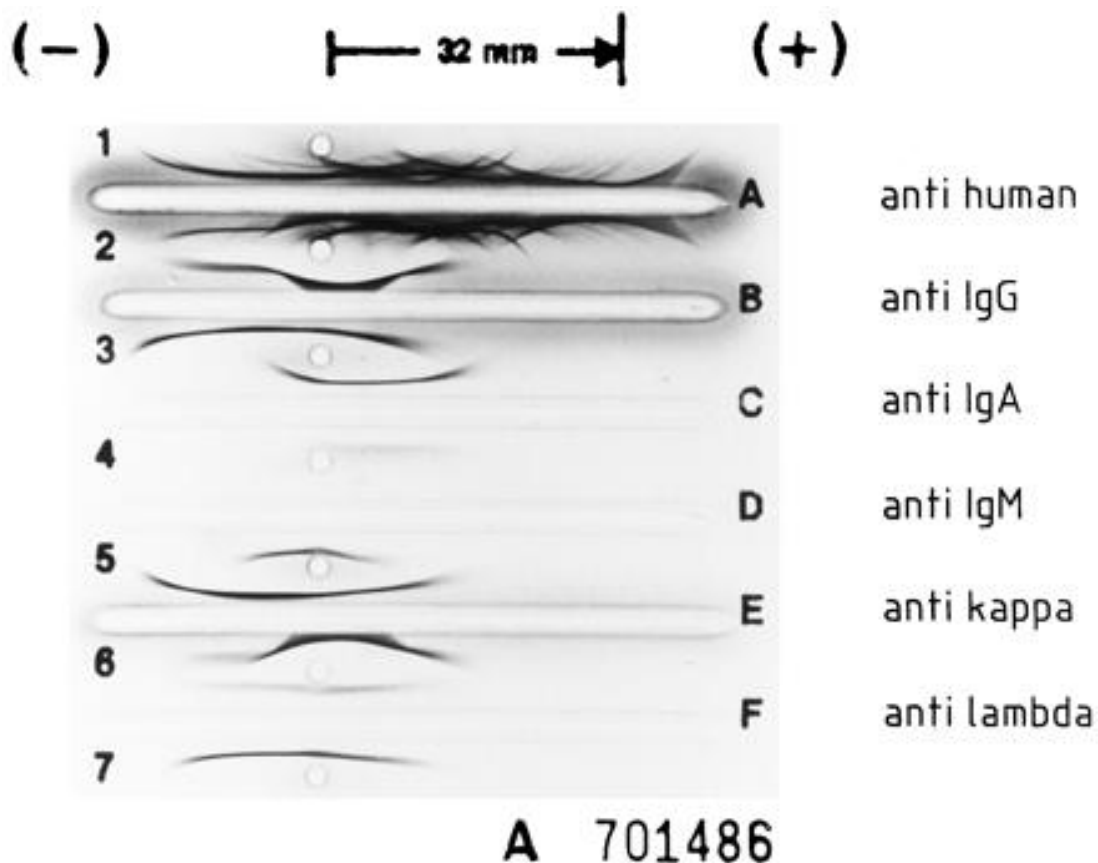
Immunoelectrophoresis (IEP)

วิธีจะใช้เทคนิคของ electrophoresis ร่วมกับ immunodiffusion เพื่อตรวจหาแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในซีรัม (รูปที่ 6) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. electrophoresis คือการใช้กระแสไฟฟ้าแยกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในซีรัม โดยหยดซีรัมลงในหลุมวุ้น โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนตัวได้ต่างกันเมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าในตัวกลางที่มีฤทธิ์เป็นด่างโปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนตัวไปหาประจุบวก โดยแต่ละกลุ่มจะมีตำแหน่งที่อยู่ต่าง ๆ กัน ยกเว้น gamma globulin จะเคลื่อนตัวไปทางประจุลบ เนื่องจาก gamma globulin มีประจุลบน้อยทำให้ buffer ที่มีประจุบวกเกิดการพัดพาไปหาขั้วลบ จึงสามารถที่จะพัดพา gamma globulin ไปทางขั้วลบ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า

electroendosmosis

2. Gel diffusion คือ เมื่อเสร็จขั้นตอน electrophoresis แล้วให้เจาะวุ้นเป็นแนวยาวขนานกับตำแหน่งของโปรตีนที่แยกได้ เติมแอนติบอดีลงในร่องวุ้น แอนติเจนและแอนติบอดีจะกระจายเข้าหากันเกิดเป็นเส้นตะกอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนวุ้น



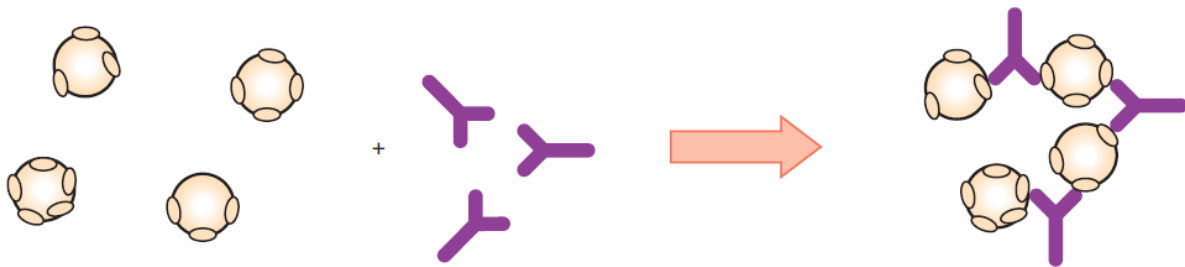
(ที่มา www.clinchem.org/content/44/5/944/F5.expansion)

ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination)

ปฏิกิริยานี้จะเกิดเมื่อแอนติเจนที่เป็นอนุภาค (particulate antigen) จับกับแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยแอนติบอดีจะเป็นตัวเชื่อมโยงให้เกิดการเกาะกลุ่มก้อนที่ใหญ่ขึ้น (clumping) แอนติบอดีที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา agglutination ได้จะเรียกว่า agglutinin แอนติบอดีชนิด IgM จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าชนิด IgG เนื่องจากมี combining site ถึง 10 ตำแหน่ง การเกิดปฏิกิริยานี้สามารถให้ผลเป็นเชิงคุณภาพหรือเชิงกึ่งปริมาณได้ โดยอาจแสดงผลเป็นค่า titer ซึ่งเป็นส่วนกลับกับ dilution สูงสุดของสิ่งส่งตรวจที่ยังคงทำให้เกิดปฏิกิริยา

Direct agglutination

วิธีนี้แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์ได้โดยตรง เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มที่มองเห็นได้นิยมใช้ในการตรวจหาหมู่เลือด ABO บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง และการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียปฏิกิริยา agglutination ที่เป็นการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงสามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า hemagglutination



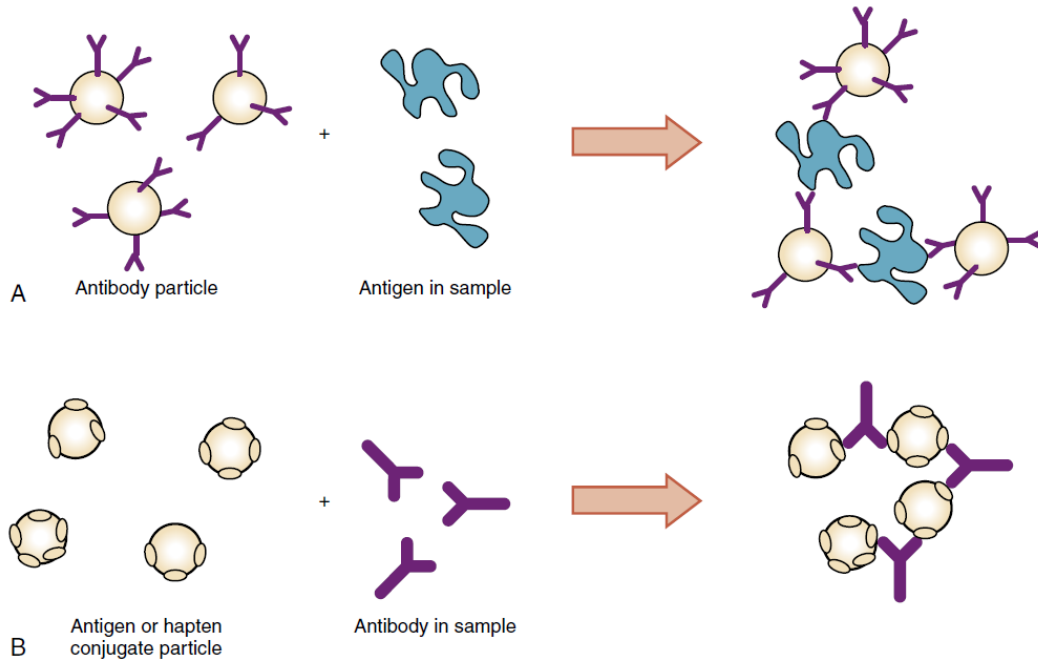
(ที่มา Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 23rd ed.)

Passive agglutination หรือ indirect agglutination

แอนติเจนบางอย่างไม่ได้อยู่บนเซลล์หรือบน solid support แต่เป็น soluble antigen หรือ hapten ซึ่งไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา agglutination ได้ แต่แอนติเจนเหล่านี้สามารถนำมาเคลือบผิวอนุภาคที่มีสมบัติจะไม่รบกวนปฏิกิริยา (inert particle) เช่น latex, gelatin หรือเม็ดเลือดแดง ตัวอย่างของ passive agglutination เช่น ถ้าใช้เม็ดเลือดแดงเคลือบแอนติเจนที่เป็นโปรตีน สามารถใช้สารจำพวก tannic acid หรือ chromic chloride ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงให้เซลล์สามารถดูดซับแอนติเจนได้

Reverse passive agglutination

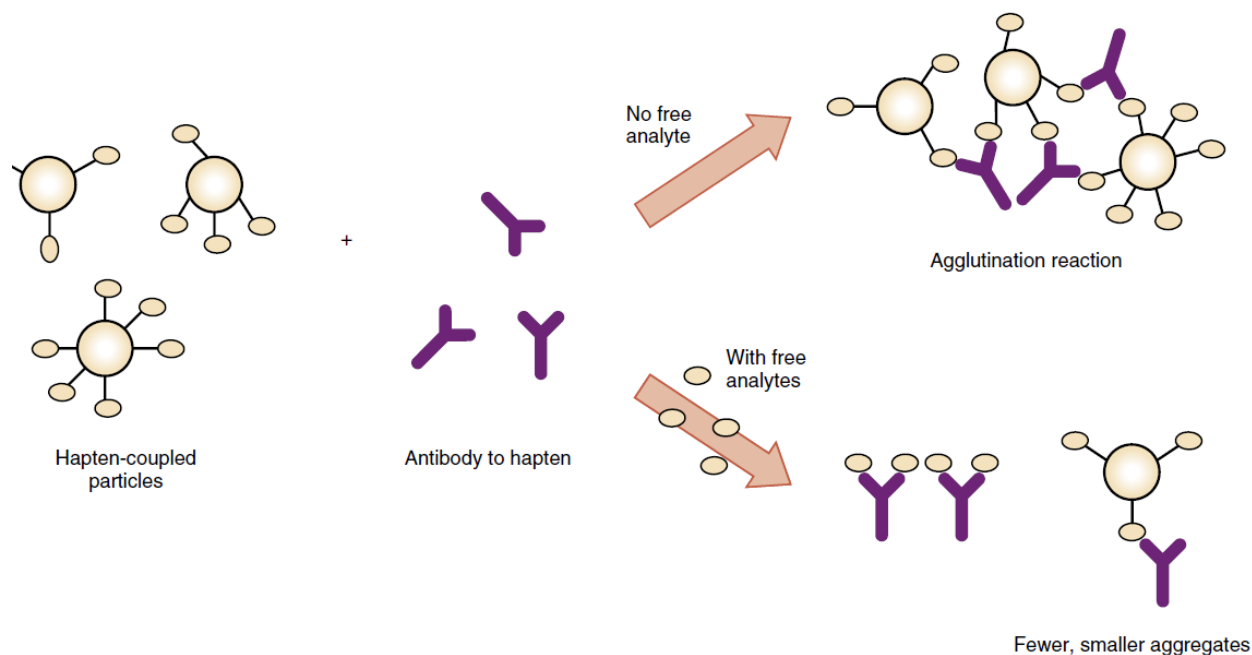
วิธีนี้ใช้หลักการเดียวกับ passive agglutination แตกต่างที่เป็นการเคลือบ inert particle ด้วย แอนติบอดี โดยให้ส่วน Fc ของ immunoglobulin เคลือบติดกับ inert particle วิธีนี้จะใช้เพื่อตรวจหา แอนติเจน



(ที่มา Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 25th ed.)

Agglutination inhibition

ไวรัสบางชนิดสามารถจับกับเม็ดเลือดแดงสัตว์บางชนิด และทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ ฉะนั้นด้วยคุณสมบัติดังนี้จึงสามารถนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสนี้ได้ ถ้าในซีรัมที่ใช้ทดสอบมี แอนติบอดีเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับไวรัสก่อน แอนติบอดีก็จะจับไวรัสทำให้ไวรัสถูก neutralize เมื่อใส่เม็ด เลือดแดงลงไปไวรัสที่ถูก neutralize ก็จะไม่สามารถจับกับเม็ดเลือดแดง จึงไม่สามารถเกิด hemagglutination ผลที่ได้จึงถือว่าเป็นลบ ถ้าไม่มีแอนติบอดีในซีรัม ผลจะทำให้เกิด hemagglutination ได้ ผลที่ได้จะเป็นลบ



(ที่มา Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 23th ed.)

เอกสารอ้างอิง

พยาธิวิทยาคลินิก ครั้งที่ 3, ภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 2552.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease, 9th ed. Elsevier Saunder, Philadelphia, 2015.

Laposata M, editor. Laboratory Medicine: The Diagnosis of Disease in Clinical Laboratory, 2nd ed. New York:McGraw-Hill, 2014.

Mcpherson RA, Pincus MR, itors. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 24th ed. Burlington, Massachusetts:Elsevier, 2021.