

7-1-1980

เปรียบเทียบวิธี reversed passive haemagglutination กับ counter-immunoelectrophoresis ในการตรวจหาแอนติเจนตัวอีกเสบิชชนิดพิว

สมหญิง ชัมวาสร

สดีใส เวชชาชีวะ

ติลก เย็นบุตร

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal>

 Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

ชัมวาสร, สมหญิง; เวชชาชีวะ, สดีใส; and เย็นบุตร, ตีลก (1980) "เปรียบเทียบวิธี reversed passive haemagglutination กับ counter-immunoelectrophoresis ในการตรวจหาแอนติเจนตัวอีกเสบิชชนิดพิว," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 24: Iss. 4, Article 5.

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal/vol24/iss4/5>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

เปรียบเทียบวิธี reversed passive haemagglutination กับ counter-immunoelectrophoresis ในการตรวจหา แอนติเจนตับอักเสบบีชนิดผิว

สมหญิง ธัมวาสร*
สกลใส เวชชาชีวะ*
ฉิลก 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

เป็นที่ยอมรับกันว่าแอนติเจนตับอักเสบบีชนิดผิว (Hepatitis B surface antigen หรือ HB_sAg) ซึ่งแต่ก่อนเรียกกันว่า Australia antigen, hepatitis associated antigen หรือ serum hepatitis antigen (3) เป็นสิ่งที่บ่งชี้ถึงภาวะการติดเชื้อตับอักเสบบีชนิดบี (4) การตรวจหาแอนติเจนนี้ในห้องปฏิบัติการจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยวินิจฉัยโรค วิธี การทดสอบเพื่อตรวจหาแอนติเจนตับอักเสบบีชนิดผิวมีมากมายหลายวิธี 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 เป็นวิธีที่มีความไวมากที่สุดแต่มีข้อเสียคือเสียค่าใช้จ่ายสูงและอันตรายอันอาจเกิดขึ้นจากการปฏิบัติงานกับสารกัมมันตรังสี สำหรับวิธี reversed passive haemagglutination นั้นพบว่าให้ผลดีมาก วิธีการง่าย

ทำได้รวดเร็ว มีความไวสูงยิ่งถ้าใช้เม็ดเลือดแดงของมนุษย์เคลือบผิวด้วยแอนติบอดี anti- HB_s ที่เตรียมจากหนูตะเภาจะให้ผลการทดสอบไวใกล้เคียงกับวิธี radioimmunoassay ถ้าใช้เม็ดเลือดแดงของแกะเคลือบผิวด้วยแอนติบอดี anti- HB_s ที่เตรียมจากแกะจะให้ผลไวกว่าวิธี counter-immunoelectrophoresis เล็กน้อย ถ้าใช้เม็ดเลือดแดงของไก่วงเคลือบด้วยแอนติบอดี anti- HB_s ที่เตรียมจากม้าจะให้ผลที่ไวอยู่กึ่งกลางระหว่างวิธีเอเจนท์ทั้งสองที่กล่าวถึงนั้น (4)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อจะเปรียบเทียบค่าของวิธี reversed passive haemagglutination ในแง่ของความไว ความรวดเร็ว ความสะดวกง่ายดาย และค่าใช้จ่ายเทียบกับวิธี counter-immunoelectrophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่ทำอยู่เป็นประจำของแผนกจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในการตรวจหาแอนติเจนตับอักเสบบีชนิดผิว

วัสดุและวิธีการ

นำซีรัมของผู้ป่วยจำนวน 115 ราย ซึ่งแพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น (ทั้งผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน) สงสัยว่าเป็นโรคตับอักเสบบีจากไวรัส มาตรวจหาแอนติเจนตับอักเสบบีชนิดผิว โดยวิธี counter-immunoelectrophoresis และวิธี

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

Counter-immunoelectrophoresis(CIE):
เป็นการทดสอบที่ทำเป็นประจำอยู่แล้วในแผนก
จุลชีววิทยา โดยใช้แอนติบอดีจาก pooled
human sera ที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจน
ตับอักเสบบีชนิดผิว (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 เป็นเม็ดเลือดแดง
ของไก่วงเคลือบผิวด้วย anti-HB_s ที่เตรียม
จากม้า control cell เป็นเม็ดเลือดแดงของไก่
วงเคลือบผิวด้วย normal globulin ของม้า
วิธีการทดลองขั้นแรกทำ screening test เสีย
ก่อน โดยทำซีรัมให้เจือจางเป็น 1 : 8 ด้วย
diluent buffer ใน microtiter plate หลังจาก
ให้ทำปฏิกิริยากับ test cell เป็นเวลา ๕-1 ชั่วโมง
จึงนำมาอ่านผลดูการเกาะกลุ่มตกตะกอน รายที่
ให้ผลบวกต้องนำมาทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผล

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสอบยืนยัน
ผลเป็น 2 วิธีคือ วิธีแรกนำซีรัมมาทำให้เจือ
จาง 2 ชุด เป็น 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8,.....1 : 256
แล้วให้ทำปฏิกิริยากับ test cell เทียบกับ
control cell ถ้าซีรัมทำปฏิกิริยากับ test cell
ให้โคแอกูเลชันสูงกว่าทำกับ control cell อย่างน้อย

4 เท่าจึงถือว่าเป็นผลบวก ถ้าไม่ถึง 4 เท่าถือว่าเป็น
false positive จึงนำซีรัมมาทำให้เจือจาง
เพียงชุดเดียวก่อนแล้วทดสอบกับ control cell
อย่างเดียว ถ้าได้ผลบวกที่ 1 : 2 หรือให้ผลลบ
ให้แปลผลว่าการทดสอบให้ผลบวกได้เลย ถ้าได้
ผลบวกที่สูงกว่า 1 : 2 จึงนำซีรัมมาทำปฏิกิริยา
กับ test cell แล้วจึงแปลผล วิธีที่สองให้ absorb
ซีรัมเสียก่อนด้วย control cell ใช้สัดส่วน 1 : 5
แล้วทำให้เจือจางเป็น 1 : 8 ด้วย diluent buffer
ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำมาบั่นให้เซลล์ตกแล้วนำ
น้ำใสส่วนบนมาทำปฏิกิริยากับ test cell ถ้าให้
ผลบวกก็แปลผลว่าการทดสอบให้ผลบวก ถ้า
ให้ผลลบถือว่าเป็น false positive

ผล

จากการทดสอบซีรัมทั้งหมด 115 ราย
ปรากฏว่า พบผลบวกจากวิธี counter-immuno-
electrophoresis 15 ราย (13.04%) และจากวิธี
rapid passive haemagglutination 27 ราย
(23.48%) วิธี rapid passive haemagglutina-
tion ให้ false positive 3 ราย (2.61%) ตั้ง
แสดงไว้ในตาราง ซีรัม 15 รายที่พบผลบวก
จากวิธี counter immunoelectrophoresis ก็
ตรวจพบผลบวกจากวิธี rapid passive haem-
agglutination ทุกราย มีซีรัมที่ให้ผลบวก
เฉพาะเมื่อทดสอบด้วยวิธี reversed passive
haemagglutination เท่านั้น 12 ราย และไม่มี
ซีรัมใดให้ผลบวกเฉพาะเมื่อทดสอบด้วยวิธี
counter-immunoelectrophoresis

ตาราง ผลการตรวจพบแอนติเจนตับอักเสบบีชนิดผิว (HB_sAg) ด้วยวิธี counter-immunoelectrophoresis 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 จากผลการทดสอบ จะเห็นได้ว่าวิธี reversed passive haemagglutination มีความไวกว่าวิธี counter-immunoelectrophoresis อย่างเห็นได้ชัด เมื่อนำข้อมูลมาทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Chi square พบว่าวิธี reversed 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-immunoelectropho-

resis เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น ๆ พบว่าผลของการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับรายงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (1) ซึ่งทำการศึกษาในซีรัมของผู้บริจาคเลือด 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 haemagglutination เมื่อทำ screening test อาจให้ผลบวกหลอก เนื่องจากซีรัมของคน

ปกติอาจทำปฏิกิริยากับ globulin ของม้าหรือ เม็ดเลือดแดงของสัตว์ได้ จึงต้องนำมาทดสอบ เพื่อยืนยันผลอีก จะเสียเวลาในการทดลองมากกว่าวิธี counter-immunoelectrophoresis ใน ขั้นตอนทดสอบเพื่อยืนยันผลตามคำแนะนำของ บริษัทผู้ผลิตให้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการทดสอบด้วยซีรัม เมื่อทำปฏิกิริยากับ test cell จะให้ไตเตอร์สูงกว่าเมื่อทำปฏิกิริยากับ control cell 4 เท่าเป็น อย่างน้อย และขั้นตอนที่เป็นการทำ absorption test โดยใช้ confirmatory kit ซึ่งผลิตขายเป็น อีกชุดหนึ่ง การศึกษาครั้งนี้พิสูจน์ยืนยันผลโดย ทำขั้นตอนที่ 1 ส่วนขั้นตอนที่ 2 ได้ดัดแปลง ใช้ control cell ใน screening kit absorb ซีรัมแทน แม้ว่าจะมีความเจือจางกว่าเซลล์ที่ใช้ ใน confirmatory kit ประมาณ 10 เท่า จาก การทดลองก็ปรากฏว่าการพิสูจน์เพื่อยืนยันให้ ผลตรงกันทั้ง 2 ขั้นตอน ในซีรัมที่ให้ผลบวก จริงและผลบวกหลอก ในเรื่องของค่าใช้จ่ายวิธี counter-immunoelectrophoresis เสียค่าใช้จ่าย ประมาณตัวอย่างละ 5 บาท ซึ่งนับว่าถูก มากและไม่ต้องซื้อรีเอเจนท์จากต่างประเทศ ส่วนวิธี reversed passive haemagglutination ต้องสั่งซื้อชุดจากต่างประเทศ บางครั้งไม่ สะดวกต้องมีการ รอคอยและในเรื่องราคานั้น การทำ screening test 1 ตัวอย่างเสียค่าใช้จ่าย

ประมาณ 30 บาท ถ้าทำการพิสูจน์ยืนยันผล ค่ายตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตจะเสียค่าใช้จ่ายถึง 390 บาท (screening test 30 บาท ทา ไทเตอร์ของซีรัม 240 บาท confirm test 120 บาท) ถ้าวิธีการ absorb ซีรัมด้วย control cell ดังกล่าวมาแล้วในการทดลองครั้งนี้ได้ผล 100% จะเสียค่าใช้จ่ายเพียงตัวอย่างละ 60 บาท (screening test 30 บาท วิธี absorb 30 บาท) จึงนำ ที่จะทำการศึกษเปรียบเทียบต่อไปให้ได้ข้อมูล เพิ่มขึ้นพอที่จะกล่าวยืนยัน ได้แน่นอนว่าวิธี absorb ด้วย control cell ใน screening kit นี้ใช้ได้จริง

อย่างไรก็ตามการตรวจหาแอนติเจนตับ อักเสบบีชนิดผิวโดยเฉพาะในผู้บริจาคเลือดควรร นำวิธี reversed passive haemagglutination มาใช้โดยทำเพียง screening test แม้ว่าค่าใช้จ่ายจะสูงเป็น 6 เท่าของวิธี counter-immunoelectrophoresis สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงนอกจาก ค่าใช้จ่ายคือเรื่องความไวของวิธีทดสอบ มีรายงานว่าการให้เลือด แม้ผู้รับเลือดจะได้รับ เลือดที่ได้ทำการตรวจโดยวิธีที่ไวที่สุดคือ radioimmunoassay ว่าปราศจากแอนติเจน แล้วก็ตาม ก็ยังมีผู้รับเลือดจำนวนหนึ่งป่วยเป็น โรคตับอักเสบบ่อยเสมอ (8) การทำ screening test อาจให้ผลบวกหลอกบ้าง Cazer และ ผู้ร่วมงาน (6) รายงานว่าพบ 0.25% จาก

การทำในผู้บริจาคเลือด 14,393 ราย ในการศึกษาครั้งนี้พบผลบวกหลอก 2.61% การคัดเลือกเลือดที่ไม่มีแอนติเจนออกก็ยังคงดีกว่าจะคัดเลือกที่มีแอนติเจนเข้ามาเป็นจำนวนมาก ในเรื่องของการตรวจวินิจฉัยซีรัมผู้ป่วยนั้น ในรายที่การดำเนินของโรคเป็นแบบปัจจุบัน เวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างตรวจจะมีอิทธิพลอย่างมาก ต่อความยากง่ายในการตรวจหาแอนติเจน ทั้งนี้เนื่องจากระดับแอนติเจนสูงที่สุดนั้น จะเกิดขึ้นตอนเริ่มมีอาการของโรคหรือก่อนจะมีอาการเสียด้วยซ้ำ การเก็บเลือดเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคนั้นมักจะเก็บเมื่อป่วยมาแล้วหลายวันหรือหลายสัปดาห์หลังมีอาการ วิธีการที่นำมาทดสอบที่ไว

ที่สุดเท่านั้นจึงจะเป็นวิธีที่เหมาะสมเพื่อให้ได้การวินิจฉัยโรคที่จำเพาะได้ถูกต้องแน่นอนที่สุด สำหรับในรายที่มีภาวะติดเชื้อปัจจุบัน (4) จึงน่าจะนำวิธี reversed passive haemagglutination เฉพาะ screening test มาใช้ทดสอบเสียก่อน ถ้าให้ผลบวกจึงทดสอบซ้ำด้วยวิธี counter-immunoelectrophoresis เมื่อ counter-immunoelectrophoresis ให้ผลบวกด้วยจะเป็นการพิสูจน์ยืนยันผลว่าบวกจริง ถ้า counter-immunoelectrophoresis ให้ผลลบควรจะพิสูจน์ยืนยันว่าบวกจริงโดยใช้วิธีที่ตัดแปลงดังกล่าวข้างต้นจะลดค่าใช้จ่ายลงได้มาก

อ้างอิง

1. จันทนา กุณเอนก, บุญส่ง พจนการณ และนาซีรัตน์ 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-antibody radioimmuno-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.