บทที่ 8

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี
(Antigen-Antibody reactions)

แอนติเจน (Ag) และแอนติบอดี (Ab) สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์มากมายหลายอย่าง เช่น นำมาช่วยในการวินิจฉัย ดังนั้นจึงควรทราบหลักทั่วๆ ไปของปฏิกิริยาต่างๆ เหล่านี้ หลักของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเหล่านี้มีผลทำให้เข้าใจ immunological phenomenon ต่างๆ ได้ลึกซึ้งดียิ่งขึ้น

แอนติบอดีจะมีตำแหน่งที่สามารถยึดเกาะกับแอนติเจนได้อย่างน้อย 2 ด้าน (2 combining sites หรือ bivalent) ส่วนแอนติเจนจะมีตำแหน่งที่สามารถเกาะกับแอนติบอดีได้หลายด้านหรือหลาย epitope

แอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะและแสดงลักษณะ (manifestation) ของปฏิกิริยารูปต่างๆ ออกมา บางกรณีก่อให้เกิดผลที่สามารถมองเห็นได้ เช่น เป็นตะกอนหรือมีการเกาะกลุ่มของแอนติเจนที่เป็นเซลล์เกิดขึ้น เป็นต้น และบางกรณีจะต้องมีการติดฉลากที่แอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยสารบางชนิดที่ทำให้เห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจนขึ้น ดังนั้นจึงได้แบ่งปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีตามลักษณะของปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดสอบได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์ (Neutralization)
2. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน (Precipitation) ซึ่งให้ชื่อแอนติบอดี ว่า Precipitin
3. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (Agglutination) ซึ่งให้ชื่อแอนติบอดี ว่า Agglutinin
4. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตรึงคอมพลีเมนต์ (Complement fixation) ซึ่งให้ชื่อแอนติบอดี ว่า Complement fixing antibody
5. การทดสอบที่ใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีติดฉลาก (Method with labelled antigen or labelled antibody)

การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์ (Neutralization)

แอนติบอดีมีความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ (neutralization) แอนติเจน ปฏิกิริยาการลบล้างที่ใช้เป็นหลักการทดสอบหาแอนบอดีต่อเชื้อจุลินทรีย์ หรือสารพิษของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ โดยนำสิ่งส่งตรวจ เช่น serum มาทำปฏิกิริยากับแอนติเจน แล้วตรวจดูฤทธิ์ของแอนติเจนว่ายังคงเหลืออยู่หรือไม่ ถ้า serum สามารถลบล้างฤทธิ์ของแอนติเจนได้ก็จะไม่สามารถตรวจพบฤทธิ์ของแอนติเจน เช่น

การหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ เช่น เชื่อไวรัส Rubella, influenza, Denque เป็นต้น มีแอนติเจนที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์ปีกเกิดการเกาะกลุ่มได้ ไวรัส Polio และ

Coxsacki B ทำให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงตายได้ ไวรัสพิษสุนัขบ้าทำให้สัตว์ทดลองตาย เป็นต้น จึงสามารถตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสเหล่านี้ได้ โดยการตรวจดูว่าฤทธิ์ของไวรัสเหล่านี้ถูก ลบล้างไปหรือไม่ ในกรณีที่ไวรัสแอนติเจนมีฤทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (hemagglutination) ปฏิกิริยา neutralization ที่เกิดขึ้นกับแอนติเจนของไวรัส เรียกว่า hemagglutination inhibition

ปฏิกิริยา neutralization ของ antitoxin สามารถทำให้ฤทธิ์ของพิษ (toxin) หมดไป ทำได้ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* และอาจใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอนในการทดสอบได้ อธิบายปฏิกิริยาระหว่าง toxin-antitoxin ได้ตาม Law of multiple proportion

Quantitative neutralization tests

เป็นวิธีการทดสอบเพื่อหาปริมาณหรือจำนวนของ virus หรือ toxin ซึ่งมีวิธีการทำโดยย่อ คือ serial dilution ของ virus หรือ toxin ฉีดเข้าสัตว์ทดลองที่เหมาะสมแล้วคอยติดตามดูการตายของสัตว์ ซึ่งระยะเวลาที่ติดตามขึ้นอยู่กับสัตว์ทดลองที่ใช้ เช่น หนู ต้องคอยติดตามดูประมาณ 14-21 วัน ถ้ามีการตายหลังจากฉีด 24 ชั่วโมง ไม่ถือว่าเป็นการตายเนื่องจากเชื้อ หรือ toxin ถือว่าเป็น trauma death เมื่อทราบจำนวนสัตว์ที่ตายและสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ก็สามารถคำนวนหาค่า 50 % end points (LD_{50}, ID_{50} หรือ TCD_{50})

LD_{50} (50% lethal dose) หมายถึงขนาดของพิษ (toxin) หรือเชื้อ ซึ่งสามารถฆ่าสัตว์ทดลองที่มีน้ำหนักที่กำหนดไว้ เป็นจำนวน 50% ภายในเวลาที่กำหนดไว้

ID_{50} (50% Infective dose) หมายถึงขนาดของพิษ (toxin) หรือเชื้อ ที่ทำให้สัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งเป็นโรค

TCD_{50} (50% tissue culture dose) หมายถึงขนาดของพิษ (toxin) หรือเชื้อ ที่ทำให้จำนวนเซลล์ ที่เพาะเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลงไปครึ่งหนึ่ง (CPE)

Neutralization *in vitro* อื่น ๆ

เช่น ดูการ neutralize พิษในหลอดแก้ว เช่น ซีรั่มที่มี antistreptolysin 0 สามารถหยุดยั้งฤทธิ์ของ streptolysin 0 ที่จะทำลายเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลองได้ เป็นต้น

ตารางที่ 8-1 Animal mortality data

Virus dilution	Mortality Ratio	Died	Survived	% of daed
10^{-1}	8/8	8	0	100
10^{-2}	8/8	8	0	100
10^{-3}	7/8	7	1	88
10^{-4}	2/8	2	6	25
10^{-5}	0/8	0	8	0

ตารางที่ 8-2 Accumulated values from mortality data

Virus Dilution	Died	Survived	Mortality Ratio	Mortality Percent
10^{-1}	25	0	25/25	100
10^{-2}	17	0	17/17	100
10^{-3}	9	1	9/10	90
10^{-4}	2	7	2/9	22
10^{-5}	0	15	0/15	0

การคำนวนค่า LD_{50} titer โดยวิธีของ Read-Miench

หาค่า proportionate distance ระหว่าง 2 dilution ที่มีการตายของสัตว์ใกล้เคียง 50 % คือ มากกว่า 50% และน้อยกว่า 50 % จากตัวอย่างคือ 10^{-3} และ 10^{-4}

$$\text{Proportionate distance} = \frac{\%\ \text{mortality above 50} - 50\,\%}{\%\ \text{mortality above 50} - \%\ \text{mortality below 50}\,\%}$$

$$= \frac{90 - 50}{90 - 22}$$

$$= \frac{10}{68}$$

$$= 0.6$$

Negative logarithm of LD_{50} titer

= Negative log of dilution above 50 % mortality+ Proportionate distance

= 3.0 + 0.6

= 3.6

LD_{50} titer = $10^{-3.6}$

การคำนวนค่า Ld_{50} titer โดยวิธีของ Kaerber

$$\text{Log } LD_{50} = 0.5 + \text{log of higest concentation of virus used} - \frac{\text{sum of \% of dead animals}}{10}$$

$$\text{Log } LD_{50}\text{ titer} = 0.5 + (-1.0) - \frac{100+100+88+25}{10}$$

$$= 0.5 - 1.0 - 3.1$$

$$= -3.6$$

LD_{50} titer $10^{-3.6}$

Neutralization index

เป็นค่าที่แสดงถึงจำนวน virus หรือ toxin ว่าถูก neutralize ด้วย specific antibody ไปมากน้อยแค่ไหน หรือเป็นค่าที่แสดงอัตราส่วน (ratio) ระหว่าง Control LD_{50} (คือมีแต่ toxin หรือ virus ไม่ผสม antibody กับ LD_{50} titer ของ serum ผสมกับ virus หรือ toxin เพราะ ฉะนั้นการที่จะทราบค่า neutralization index จำเป็นต้องทำการทดลองกับสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชุด สมมติว่าจากการทดลองของ virus ผสมกับ antibody ใน serum ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 8-3 Animal mortality data จากการที่ใช้ virus ผสมกับ immune serum

Virus + serum Dilution	Mortality ratio	Died	Survived	% of daed
10^{-1}	4/8	4	40	50
10^{-2}	1/8	1	7	13
10^{-3}	0/8	0	8	0

ตารางที่ 8-4 Accumulated value from mortality data

Virus + serum			Mortality	
Dilution	Died	Survived	Ratio	Percent
10^{-1}	5	4	5/9	56
10^{-2}	0	11	1/12	8
10^{-3}	1	19	0/19	0

การคำนวนค่า LD_{50} titer โดยวิธีของ Read-Miench

Proportionate distance $= \frac{56-50}{56-8}$

$= \frac{6}{48}$

$= 0.1$

Negative logarithm of LD_{50} titer $= 1.0 + 0.1$

$= 1.1$

LD_{50} titer $= 10^{-1.1}$

Neutralization index = antilog of above value

Log of neutralization index = 3.6-1.1

= 2.5

Neutralization index = antilog of 2.5

= 320

การคำนวนค่า Neutralization index โดยวิธีของ Kaerber

Logarithm of neutralization index $= 0.5 + (-1.0) - \frac{50+13}{100}$

$= 0.5 - 1.0 - 0.6$

$= -1.1$

LD_{50} titer $= 10^{-1.1}$

Logarithm of neutralization index $= 3.6 - 1.1$

$= 2.5$

Neutralization index = antilog of 2.5

$= 320$

การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน (Precipitation)

เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อแอนติเจนที่อยู่ในรูปสารละลาย (soluble antigen) ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะเกิด antigen-antibody complex ซึ่งอาจจะตกตะกอนให้เห็นด้วยตาเปล่าได้

หลักของปฏิกิริยาการตกตะกอน ที่เกิดในตัวกลางที่เป็นของเหลว (liquid media) ใช้เป็นหลักของ Ag-Ab reaction ทั่วๆ ไป อาจแบ่งได้เป็น 2 ขั้นดังนี้

1. การรวมตัวขั้นต้น (Primary complex) จะเกิดการรวมตัวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ในทันทีเมื่อผสมกัน แต่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า แรงยึดเหนี่ยวระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี มีได้หลายแบบคล้ายกับแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโปรตีนชนิดอื่นๆ

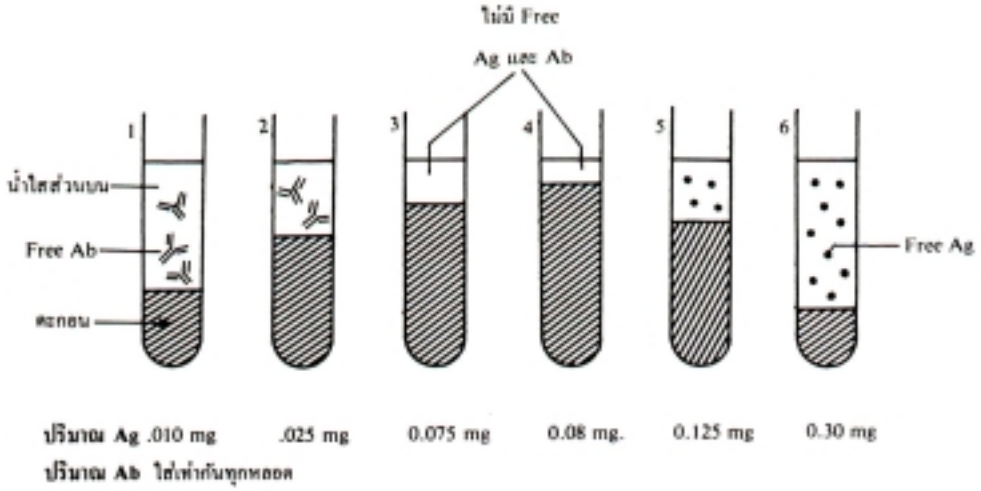
1.1 Electrostatic (Coulomb) forces ขึ้นอยู่กับประจุลบและบวกของโปรตีน ทำให้มีการรวมตัวระหว่าง แอนติเจนกับแอนติบอดี

1.2 Van der Waal forces เป็นเรื่องของการที่มีการสัมผัสของแอนติเจนและแอนติบอดี แรงนี้ขึ้นอยู่กับระยะทางระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี และปริมาณประจุ (electron clouds) รอบๆ สารนั้น โดยมีการเปลี่ยนแปลงของประจุบนโมเลกุลอันหนึ่งชั่วคราว จนเกิดประจุลบและบวกขึ้นคู่หนึ่งและชักนำให้เกิดประจุลบและประจุบวกอีกคู่หนึ่ง

1.3 Hydrogen bonding เช่น H-bond บน side chain ของสารหนึ่งโยงกับ carboxyl group ของอีกตัวหนึ่ง

1.4 Hydrophobic bonding ทำให้เกิดการผลักดันน้ำที่กั้นอยู่ระหว่างสารออกไป โมเลกุลจึงชิดกันได้

2. การเกิดเป็นกลุ่มก้อนใหญ่ (large aggregrate หรือ larger Ag-Ab complex) เป็นไปตาม Lattice hypothesis (Marrack, 1934) คือ แอนติบอดีจะเป็นตัวเชื่อมโยง แอนติเจนเข้าด้วยกันเป็นลักษณะของ lattice (ตาข่าย) และเป็นไปตาม Law of multiple proportion (Heidelberger) ที่ว่าจำนวนของตะกอนที่ได้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ในส่วนผสม



ภาพที่ 8-1 แสดงการเกิด large aggregrate หรือตะกอนที่เห็นได้ด้วยตาเปล่าในหลอดทดลอง 6 หลอดซึ่งมีสัดส่วนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่แตกต่างกัน โดยให้จำนวนแอนติบอดีคงที่แต่เพิ่มแอนติเจนจากน้อยไปหามาก

หลอดที่ 1 ลักษณะของ aggregrate หรือ Ag-Ab complex ในหลอดนี้อยู่ในสภาพแอนติบอดี มากเกินพอ เพราะฉะนั้น แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจน ทุก ๆ combining site ที่จับได้ จึงไม่มีแอนติเจนมาเชื่อมโยงให้ตะกอนใหญ่ ขึ้นเพราะฉะนั้น complex นี้จึงเล็กและตกตะกอนได้ไม่ดี จำนวนตะกอนในหลอดนี้จึงน้อย

หลอดที่ 2 เมื่อเพิ่มแอนติเจนขึ้น ก็จะมีแอนติเจนเหลือพอที่จะมาเชื่อมโยงต่อทำให้ complex ใหญ่ขึ้น เพราะฉะนั้น complex บางส่วนจะตกตะกอนทำให้ตะกอนเพิ่มขึ้น

หลอดที่ 3 แอนติเจนเพิ่มขึ้นอีก ก็จะมี large aggregrate เพิ่มขึ้น

หลอดที่ 4 ในทำนองเดียวกันจะมี large aggregrate เป็นส่วนใหญ่ในหลอดนี้ และตะกอนตกเร็ว จึงเป็นหลอดที่มีตะกอนมากที่สุด ซึ่งแสดงว่ามีสัดส่วนของแอนติเจนและแอนติบอดีที่พอเหมาะ (optimal proportion)

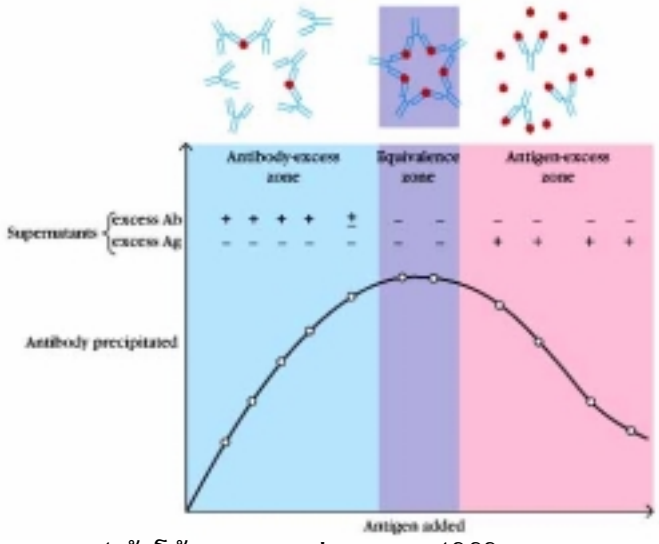
หลอดที่ 5 เมื่อแอนติเจนมากเกินไปในหลอดนี้ บางส่วนของ complex จะเป็นแบบภาพที่ 8-3 ซึ่งอยู่ในสภาพแอนติเจน excess ทำให้เกิด complex เล็ก ๆ ตกตะกอนได้ไม่ดี ตะกอนจึงน้อยลง

หลอดที่ 6 แอนติเจนมากที่สุด complex เกือบทั้งหมดจะเป็นแบบภาพที่ 8-3 ในหลอด 6 จึงแทบไม่มีตะกอนเกิดขึ้นเลย

เราสามารถเขียนกราฟเส้นโค้งแสดงจำนวนตะกอนที่เกิดขึ้นในหลอดทั้งหก และแยกเขตได้เป็น 3 เขต

1. เขตที่มีแอนติบอดีมากเกินไป (zone of antibody excess)
2. เขตที่พอเหมาะ (equivalent zone)
3. เขตที่มีแอนติเจนมากเกินไป (zone of antigen excess)

น้ำใสที่ได้หลังปั่นแยกตะกอนออกไปในแต่ละหลอดสามารถนำมาทดสอบว่ามีแอนติบอดีหรือแอนติเจนเหลืออยู่หรือไม่ โดยแยกออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งใส่แอนติเจน ถ้าหลอดไหนเกิดตะกอนแสดงว่ามีแอนติเจนหรือแอนติบอดีเหลืออยู่ โดยวิธีนี้พบว่าหลอด 1 และ 2 มี แอนติบอดีมากเกินไป เพราะมีตะกอนเกิดขึ้นเมื่อเติมแอนติเจน ส่วนหลอด 5 และ 6 มี แอนติเจนมากเกินไป เพราะมีตะกอนเกิดขึ้นเมื่อเติม แอนติบอดี



ภาพที่ 8-2 กราฟเส้นโค้งแสดงเขตต่าง ๆ ของปฏิกิริยาตกตะกอน

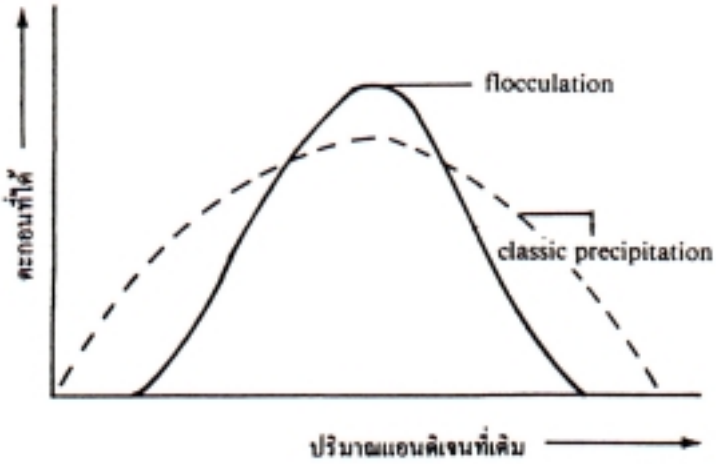
การสลายตัวของตะกอน

ตะกอนของ Ag-Ab complex จะสลายตัวได้เมื่อ

1. pH ของตัวกลางเป็นกรดหรือด่างมากเกินไป ตะกอนใหญ่จะสลาย โดยที่ primary complex ยังอยู่
2. Ionic strength สูง ๆ เช่นใน 15% NaCl
3. มี C3 และ C3b มาขวางร่างแห (lattice) ของ Ag-Ab complex
4. ความร้อนทำให้โปรตีนเปลี่ยนคุณสมบัติไป (denatured)
5. แอนติเจนหรือแอนติบอดี มากเกินไป
6. มี enzyme ทำลายแอนติเจนหรือแอนติบอดี

Flocculation type ของการตกตะกอน

มีปฏิกิริยาการตกตะกอน ซึ่งไม่เป็นไปตาม classic precipitation reaction ที่กล่าวไปแล้ว ทั้งนี้เพราะ insoluble หรือ large aggregrate จะไม่เกิดขึ้นถ้าจำนวนแอนติเจนที่เติมเข้าไปยังไม่มากพอ หรือเมื่อเติมแอนติเจนมากไป ถ้าเขียนเป็นกราฟเส้นโค้งก็จะได้ดังภาพที่ 8-4



ภาพที่ 8-3 แสดง flocculation type ของปฏิกิริยาตกตะกอน

แสดงว่าตะกอนชนิดนี้ไม่เกิดหรือเกิดน้อยมากในเขตที่มีแอนติบอดีหรือแอนติเจนมากเกินไป ดังนั้นตะกอนจึงเกิดในเขตที่แคบมาก ปฏิกิริยา flocculation เกิดใน antiserum ที่ได้จากม้า โดยเฉพาะ antiserum ต่อ diphtheria toxin และ streptococcal toxins บางชนิด นอกจากนั้นยังพบได้ใน antisera ที่ได้จากคนเช่น thyroid Ab ความแตกต่างระหว่าง flocculation และ precipitation เกิดจากอะไรก็ยังไม่มีใครทราบ แต่คิดว่าความผิดปกติคงอยู่ที่แอนติบอดีมากกว่าแอนติเจนดังที่จะเห็นว่า antiserum ที่เตรียมจากแอนติเจนอันเดียวกันในสัตว์อื่นๆ ไม่เป็น และ antiserum จากม้าเท่าที่ทราบก็มีเฉพาะ antidiphtherial toxin และ antistreptococcal toxins บางชนิดเท่านั้น antiserum อย่างอื่นๆ จากม้าก็ไม่ให้ปฏิกิริยา flocculation

ปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction)

ปกติแล้วแอนติบอดีย่อมทำปฏิกิริยากับแอนติเจนตัวที่กระตุ้น (homologous Ag) เท่านั้น ถ้าเกิดมีการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนอื่นๆ (heterologous Ag) แล้วปฏิกิริยานั้นเรียกว่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม “cross reaction” อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาจะเกิดกับ homologous Ag ได้มากกว่า heterologous แอนติเจน หลายเท่าและแอนติบอดีที่มี low avidity จะมีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มน้อยกว่าพวก high avidity Ab (avidity คือความสามารถของแอนติบอดีที่จะรวมตัวกับแอนติเจนทั้งโมเลกุล)

ปฏิกิริยาข้ามกลุ่มอาจเกิดขึ้นเพราะ

1. มีสิ่งเจือปนเข้ามาในแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นแม้เพียงเล็กน้อยขนาด 1% ก็จะเป็น immunogen ได้

2. เนื่องจากแอนติเจนต่างๆ มี determinant group มากมาย ดังนั้นอาจมี 1-2 ในจำนวน antigenic determinant ที่เหมือนกับแอนติเจนตัวอื่นๆ

3. แอนติบอดีต่อแอนติเจนที่มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกันอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ เช่นแอนติบอดีต่อ m-azobenzene sulfonate กับแอนติบอดีต่อ m-azobenzene arsonate

การกำจัด cross-reacting antibodies เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับ antiserum ที่เตรียมขึ้นเพื่อให้ได้ปฏิกิริยาจำเพาะ ถ้าพบว่า antiserum ใดมี cross-reacting Ab ก็อาจจะไม่ใช้เลย หรือถ้าจะใช้ก็ต้องกำจัด cross-reacting antibodies ออกเสียก่อน ซึ่งจะทำได้ 2 วิธี

1. Absorb เอาแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะกันทิ้งไปโดยใส่แอนติเจนที่มี cross-reaction ลงใน antiserum ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาแล้ว ปั่นเอาตะกอนทิ้งไป antiserum ที่เหลือก็คือ absorbed antiserum

2. Adsorb โดยเติม hapten ที่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มให้เกินพอ และทิ้งไว้ซึ่งจะมองไม่เห็นปฏิกิริยา และไม่ต้องปั่นออก เช่นนั้นจะได้ adsorbed antiserum

Affinity ของแอนติบอดี

เป็นความสามารถของส่วน Fab ของแอนติบอดีที่จะรวมตัวกับ antigenic determinant ได้อย่างมั่นคงเพียงใด ถ้าจับกันได้ดี หรือมี affinity สูงก็จะได้ complex ที่มั่นคง

ประโยชน์ของปฏิกิริยาการตกตะกอน

ส่วนมากใช้ทดสอบหาชนิดหรือปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีดังตัวอย่างต่อไปนี้

1. ตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อ โดยสกัดเนื้อเยื่อของสัตว์ที่ตายแล้ว เอามาตรวจกับ antiserum ดูตะกอน

2. แยกชนิดของแบคทีเรีย เช่น ตรวจหา streptococci ว่าอยู่ในหมู่ (group) ไหน หรือใช้ทำ Neufeld “Quellung reaction”แยกชนิดของ pneumococci

3. ตรวจซีรั่มเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคซิฟิลิสโดยวิธี flocculation

4. ตรวจหา C-reactive protein (CRP)

5. Forensic precipitin test เช่นตรวจว่าเป็นเลือดหมู่ไหน ของคนหรือสัตว์ เป็นต้น

6. ตรวจหา hosts ของแมลงที่ดูดเลือด

7. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์หรือระหว่างพืช

8. ใช้เป็นหลักในการทดสอบหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีโดยใช้วุ้นอย่างเดียว หรือวุ้นร่วมกับกระแสไฟฟ้า

ปฏิกิริยาการตกตะกอนในตัวกลางที่เป็นวุ้น (Precipitation in gel or semisolid media หรือ gel diffusion)

การทดสอบปฏิกิริยาในตัวกลางที่เป็นวุ้น โดยการจัดให้แอนติเจนกับแอนติบอดีอยู่ห่างกันในวุ้นอันเดียวกันแอนติเจนกับแอนติบอดีจะซึมผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้นมาพบกัน เมื่อถึงที่มีอัตราส่วนพอเหมาะแอนติเจนกับแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยารวมเป็นตะกอน เห็นเป็นเส้นสีขาวขุ่น gel diffusion เป็นวิธีสำคัญในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาของ แอนติเจน-แอนติบอดี เพราะจำนวนของเส้นที่

มองเห็นแสดงถึงจำนวนของ แอนติเจน-แอนติบอดี ในตัวอย่างที่เราทดสอบ นอกจากนี้วุ้นยังเป็นตัวทำให้ปฏิกิริยาการตกตะกอนคงอยู่ได้นานกว่าในของเหลว

หลักของ gel diffusion ได้ถูกนำมาปรับปรุงใช้ได้มากมายหลายวิธีด้วยกัน มีวิธีที่สำคัญและใช้มากที่สุดเพียง 6 วิธีดังนี้ :-

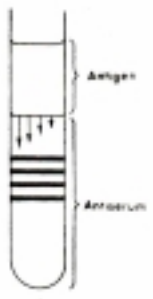
1. Single diffusion in one dimension (Oudin's method)
2. Double diffusion in one dimension (Preer's method)
3. Double diffusion in two dimensions (Ouchterlony's method)
4. Radial immunodiffusion (RID) หรือวิธีของ Mancini หรือ single diffusion in two dimensions
5. Immunoelectrophoresis (IEP)
6. Electroimmunodiffusion (EID หรือ Laurell's technic)
7. Counter-immunoelectrophoresis (CIE) หรือ Immunoelectroosmophoresis (IEOP)

Single diffusion in one dimension (Oudin's method)

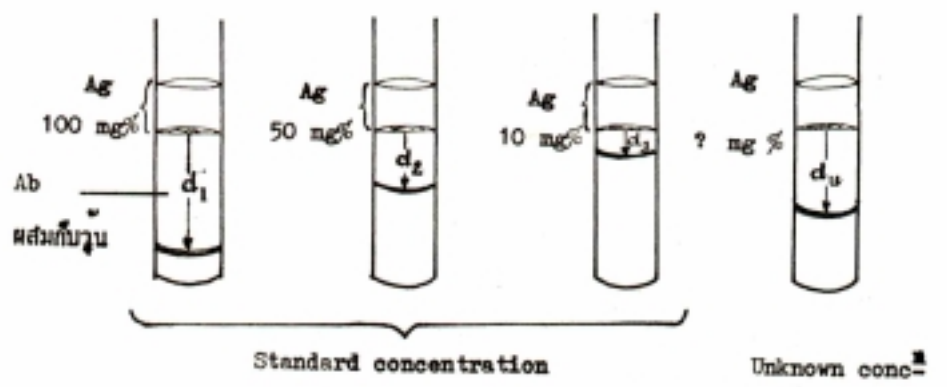
โดยผสม antiserum กับวุ้นในหลอดแก้วก่อนแล้วเติมสารละลายของแอนติเจนลงบนวุ้นดังกล่าว ถ้าจัดแอนติเจนให้มีความเข้มข้นมากกว่าแอนติบอดีแอนติเจนจะซึมผ่านลงมาเรื่อย ๆ ในวุ้นทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีเกิดเป็นเส้นตะกอนขาวขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปแอนติเจนจากส่วนบนยังซึมแทรกลงมาเรื่อย ๆ จะเกิดเส้นตะกอนเดิมจะหายไปเนื่องจากมีประมาณของแอนติเจนมากไปทำให้ Ag-Ab complex ละลายไป ดังนั้นระยะทาง (d) ที่เส้นตะกอนเคลื่อนที่ลงมาในวุ้นจะเป็นสัดส่วนกับเวลา (t) โดย $d \propto t$

นอกจากนี้อัตราความเร็วของการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับ diffusion coefficient ของแอนติเจนและความเข้มข้นของแอนติเจนดังนั้นถ้ามีแอนติเจนหลายชนิดอยู่ด้วยกันแทรกซึมลงมาพบกับ antiserum ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ จะเห็นเป็นเส้นตะกอนได้หลาย ๆ เส้น วิธีนี้จึงใช้ตรวจความบริสุทธิ์ของสารโดยดูจำนวนเส้นที่เกิดขึ้นได้

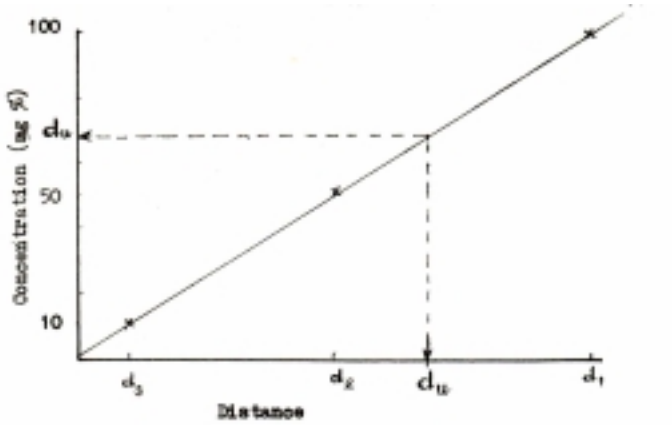
เนื่องจากอัตราการเคลื่อนที่ของเส้นขึ้นกับความเข้มข้นของแอนติเจนในกรณีที่มีปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี คู่เดียวในสิ่งที่นำมาตรวจ (monospecific Ag-Ab reaction) ทำให้คำนวณปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจนนั้นได้ โดยการวัดระยะทางของเส้น เปรียบเทียบกับ standard แอนติเจน ที่กำหนดความเข้มข้นไว้แล้ว



ภาพที่ 8-4 Single difussion in one dimension ที่มี multiple Ag-Ab complex



ภาพที่ 8-5 Single diffusion in one dimension ที่ใช้ในการหาปริมาณ antigens โดยเทียบกับ standard

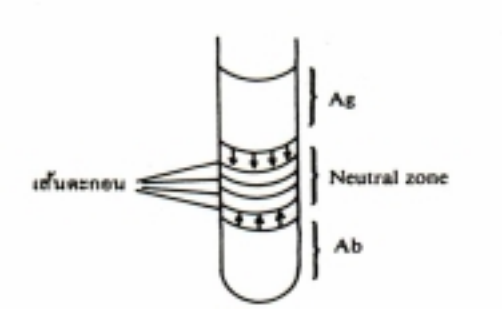


ภาพที่ 8-6 Standard curve และวิธีการอ่านค่า unknown จาก standard curve

ในทางตรงกันข้าม อาจจัดสลับกัน โดยใส่แอนติเจนใน agar ข้างล่าง แล้วหยอด antiserum ลงบนวุ้น ถ้าความเข้มข้นของแอนติบอดีมีมากกว่าแอนติเจนจะเกิด precipitation band ซึ่งค่อย ๆ เคลื่อนที่ลงในวุ้นเช่นกัน

Double diffusion in one dimension (Preer's method)

วิธีนี้ผสม antiserum ในวุ้นก่อน แล้วเติมวุ้นเปล่า ๆ ลงไปเป็น neutral zone แล้วเติมแอนติเจนเหนือวุ้นชั้นที่สอง โมเลกุลของแอนติเจนกับแอนติบอดีจะกระจายออกมาพบกัน เมื่อถึงอัตราส่วนที่พอเหมาะ (equivalence) จะเกิดเส้นตะกอนให้เห็นชัดในวุ้นชั้น neutral zone วิธีนี้เป็นวิธีที่ไวมาก และเป็นประโยชน์มากในการแสดงจำนวน แอนติเจน-แอนติบอดี ที่เกิดขึ้น ถ้าใช้ diphtheria toxin กับ anti-diphtheria toxin เป็น แอนติเจน-แอนติบอดี มาทำวิธีนี้จะเกิดเส้นตะกอน 6 เส้นด้วยกัน



ภาพที่ 8-7 Double diffusion in one dimension (Preer's method)

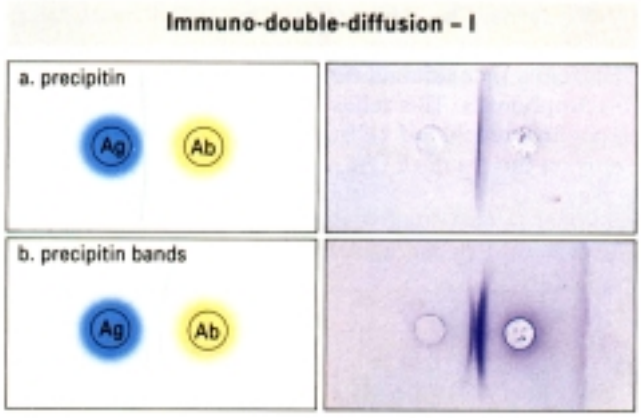
Double diffusion in two dimensions (Ouchterlony's method)

Ouchterlony ได้คิดวิธี gel diffusion ที่ง่าย สะดวก และเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง แทนการทำ gel diffusion ตามแนวดิ่งในหลอดแก้วดัง 2 วิธีแรก เขาเทวุ้นบนแผ่นราบเจาะหลุมหลายหลุมห่างกัน สำหรับใส่แอนติเจนและแอนติบอดี

วิธีนี้จัดให้หลุมต่าง ๆ เรียงกันได้หลายแบบตามความประสงค์แอนติเจนกับแอนติบอดีจะกระจายออกมาพบกัน ในอัตราส่วนที่พอเหมาะจะเกิดเส้นตะกอนขึ้น เส้นนี้จะอยู่ใกล้ทางสารที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า เช่น ถ้าปริมาณแอนติเจนมีน้อยกว่าแอนติบอดีจะเกิดเส้นใกล้หลุมที่ใส่แอนติเจน ลักษณะความโค้งของเส้นก็มีความสำคัญถ้าความเข้มข้นของแอนติเจนกับแอนติบอดีมีเท่า ๆ กันและมีขนาดของโมเลกุลใกล้เคียงกันเส้นจะปรากฏเป็นเส้นตรง ถ้าแอนติเจนมีขนาดใหญ่กว่าแอนติบอดีจะเกิดเส้นโค้งรอบ ๆ แอนติเจน ทั้งนี้เพราะอัตราการซึมผ่านของสารขึ้นกับความเข้มข้นของสารและน้ำหนักโมเลกุลของสารนี้ โมเลกุลใหญ่จะวิ่งช้า

วิธีของ Ouchterlony ยังมีประโยชน์ในการศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างกันของแอนติเจน (หรือ แอนติบอดี) มากกว่า 1 อย่างขึ้นไป ดังนี้

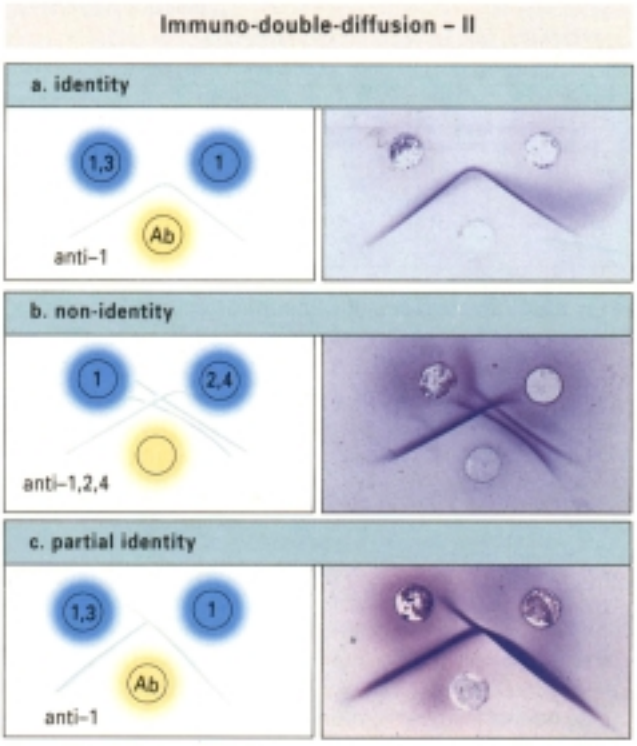
Reaction of identity ถ้าใส่แอนติเจนตัวเดียวกันลงในหลุ่ม 1, 3 1 ซึ่งติดกันและในหลุมแอนติบอดีเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นจะโค้งมาพบกันและต่อกันเป็นเส้นเรียบ ดังภาพที่ 8-9a



ภาพที่ 8-8 Double diffusion in two dimension

a). แสดงแถบที่เกิดระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ที่มีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากัน

b). แสดงแถบที่เกิดจากแอนติบอดีกับแอนติเจน 2 ชนิดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ต่างกัน



ภาพที่ 8-9 Double diffusion in two dimension

a). แสดงแถบที่เกิดระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเหมือนกัน

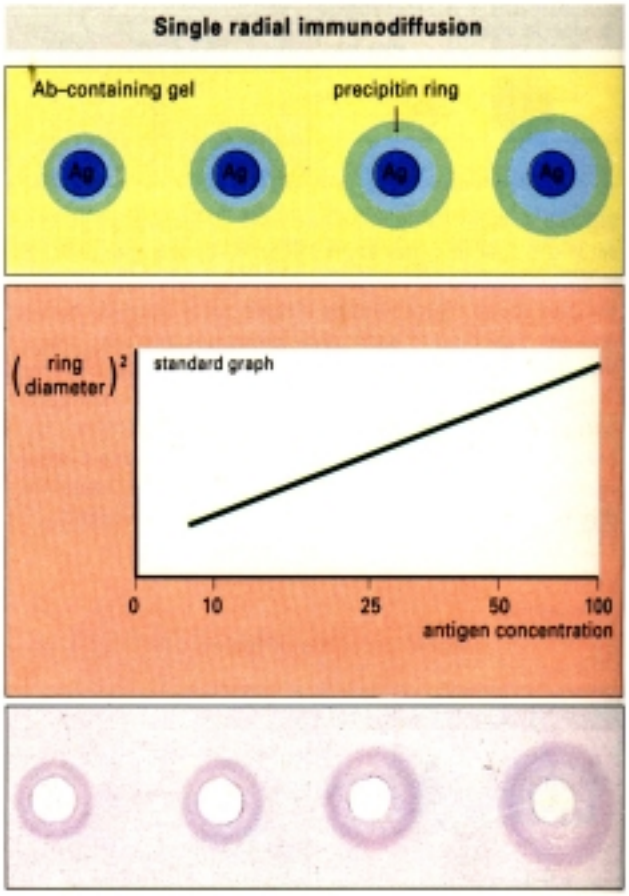
b). แสดงแถบที่เกิดระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความต่างกัน

c). แสดงแถบที่เกิดระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเหมือนกันบางส่วนและต่างกัน

Reaction of identity นี้เป็นลักษณะที่แสดงความเหมือนกันของแอนติเจนในหลุม 1, 3 และหลุม 1 แอนติเจน ในหลุม 1 กับแอนติเจนในหลุม 2, 4 เป็นแอนติเจนที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน เมื่อใส่ antiserum ที่มีทั้งแอนติบอดีต่อแอนติเจน 1 กับ แอนติบอดีต่อแอนติเจน 2, 4 ลงในหลุมกลาง เส้นตะกอนที่เกิดขึ้นจะไม่สัมพันธ์กัน และอาจตัดกันดังรูปถ้าหลุมใกล้กัน

Reaction of partial identity ถ้าแอนติบอดีในหลุมเป็นแอนติบอดีที่ specific ต่อแอนติเจนในหลุม 1, 3 แล้วใส่แอนติเจนที่มีคุณสมบัติคล้ายกับแอนติเจน 1, 3 ในหลุม 1 เส้นตะกอนที่เกิดจากแอนติเจน 1, 3 กับแอนติบอดีและจากแอนติเจน 1 กับแอนติบอดีจะมาต่อกันได้ โดยเส้นตะกอนของแอนติเจน 1, 3 จะยาวเลยออกไปและชี้ไปทางแอนติเจน 1, 3 เส้นที่ยื่นยาวออกไป (spur) นี้เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติเจน 1, 3 กับแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน 1 (เนื่องจากแอนติเจน 1 เป็นแต่ cross reacting แอนติเจน ไม่ใช่ homologous Ag)

โดยการจัดวางดังข้างต้น เราสามารถตรวจได้ว่าแอนติเจนตัวหนึ่งมีความเหมือน (identical) หรือคล้ายคลึง (partial identity) หรือต่างกัน (non-identity) กับแอนติเจนที่เราทราบได้โดยดูลักษณะเส้นตะกอนที่ปรากฏดังกล่าวแล้ว



ภาพที่ 8-10 Radial immunodifussion (RID) แสดงขนาดของวงแหวนที่เกิดใหญขึ้นเมื่อใช้แอนติเจนที่มีความเข้นข้นมากขึ้น

Radial immunodiffusion (RID) หรือวิธีของ Mancini หรือ single diffusion in two dimensions

เป็นเทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยา แอนติเจน-แอนติบอดี ในวุ้นหาปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจนหรือแอนติบอดีโดยใช้หลักของ Oudin คือใช้แอนติเจน (หรือ แอนติบอดี) ผสมในวุ้นก่อนแต่จัดให้มีการกระจายเกิดขึ้นบนพื้นราบเช่นเดียวกับ Ouchterlony โดยเจาะหลุมในวุ้นที่ผสมแอนติบอดีสำหรับใส่แอนติเจน แอนติเจนจะกระจายออกโดยรอบเป็นวงทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในวุ้น ทำให้เห็นเส้นตะกอนเป็นวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางของวงตะกอน จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่อยู่ในหลุมนั้น โดยการเปรียบเทียบกับแอนติเจนที่รู้ปริมาณ 3 ระดับ จะทำให้สามารถหาปริมาณของตัวอย่างที่นำมาหาได้โดยการอ่านกราฟที่ได้จาก standard 3 จุด (ภาพที่ 7-10) วิธีนี้นิยมใช้ตรวจหาปริมาณของ immunoglobulin, complement, transferin, CRP, fetoglobulin, ฯลฯ

Immunoelectrophoresis (IEP)

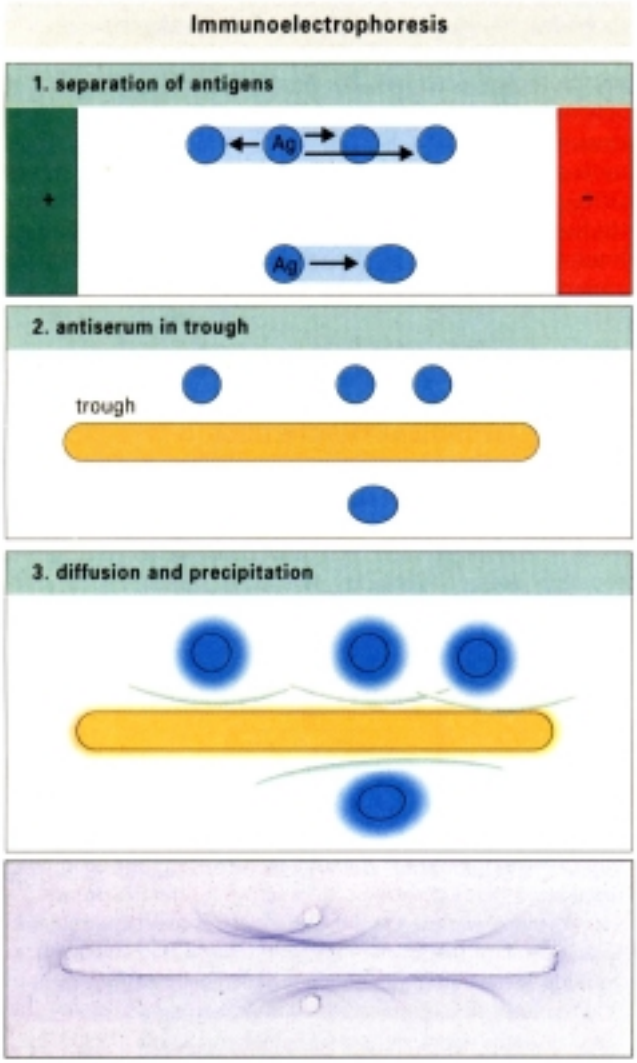
Grabar และ William ได้ใช้เทคนิคของ electrophoresis ร่วมกับ gel diffusion เป็นวิธีง่ายแต่สำคัญยิ่งในการตรวจหาแอนติเจนหลายชนิดในสารต่างๆ ได้เช่น ซีรั่ม โดยการหยอดซีรั่มลงในหลุมเล็กๆ บนวุ้นในแผ่นกระจก แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าลงไปให้โปรตีนต่างชนิดในซีรั่มเคลื่อนที่ไปตามจุดต่างๆ บนวุ้น หลังจากหยุดกระแสไฟฟ้าแล้ว เติม antiserum หรือแอนติบอดีลงในร่างที่ขนานกับแนวการเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้าแล้วปล่อยให้แอนติเจนกับแอนติบอดีกระจายออกไปพบกันเกิดเป็นเส้นต่างๆ ตาม electrophoretic mobility ของโปรตีนชนิดนั้นๆ เช่น albumin จะเคลื่อนที่ไปขั้วบวกทำปฏิกิริยากับ anti-albumin เกิดเป็นเส้นทางขั้วบวก gamma-globulin ถูกพัดกลับมาทางลบ ทำปฏิกิริยากับ anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA เกิดเป็นเส้นต่างๆ กันทางขั้วลบ โดยวิธีที่นำซีรั่มมาผ่านกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) แล้วเติม anti-human serum ลงไปนี้ ทำให้สามารถตรวจพบว่าซีรั่มของคนประกอบด้วยแอนติเจนต่างๆ ประมาณ 30 ตัว

นอกจาก immunoelectrophoresis จะเป็นประโยชน์ในการตรวจหาแอนติเจนต่างๆ ในสารและตรวจหาความบริสุทธิ์ (purity) ของสารแล้วยังใช้ศึกษาดูโปรตีนที่ผิดปกติได้ด้วย เช่น การตรวจ myeloma protein, heavy chain ของ Ig ซึ่งมี electrophoretic mobility ผิดไปจากปกติ เป็นต้น

ขั้นตอนการทำ immunoelectrophoresis

ก. Electrophoresis (ภาพที่ 8-11) หยอดซีรั่ม (Ag) ในหลุมแอนติเจนตามภาพที่ 8-11 แอนติเจนต่างๆ ในซีรั่มจะเคลื่อนที่ตามชนิดของแอนติเจนเมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงไปในตัวกลางที่มีฤทธิ์เป็นด่างโปรตีนที่มีประจุลบ จะเคลื่อนที่ไปทางบวก เช่น albumin, alpha-globulins ต่างๆ แต่ gammaglobulin จะเคลื่อนไปทางลบด้วย electroendosmosis (คือปรากฏการณ์ที่วุ้น หรือตัวกลางอื่นๆ เกิดมีประจุลบ ทำให้ buffer ทำตัวเหมือนเป็นบวกเพื่อให้สมดุล gamma-globulin มีประจุลบน้อยกว่า เคลื่อนไปทางบวกได้ช้าเพราะโมเลกุลใหญ่จึงถูกพัดพาเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบตาม buffer)

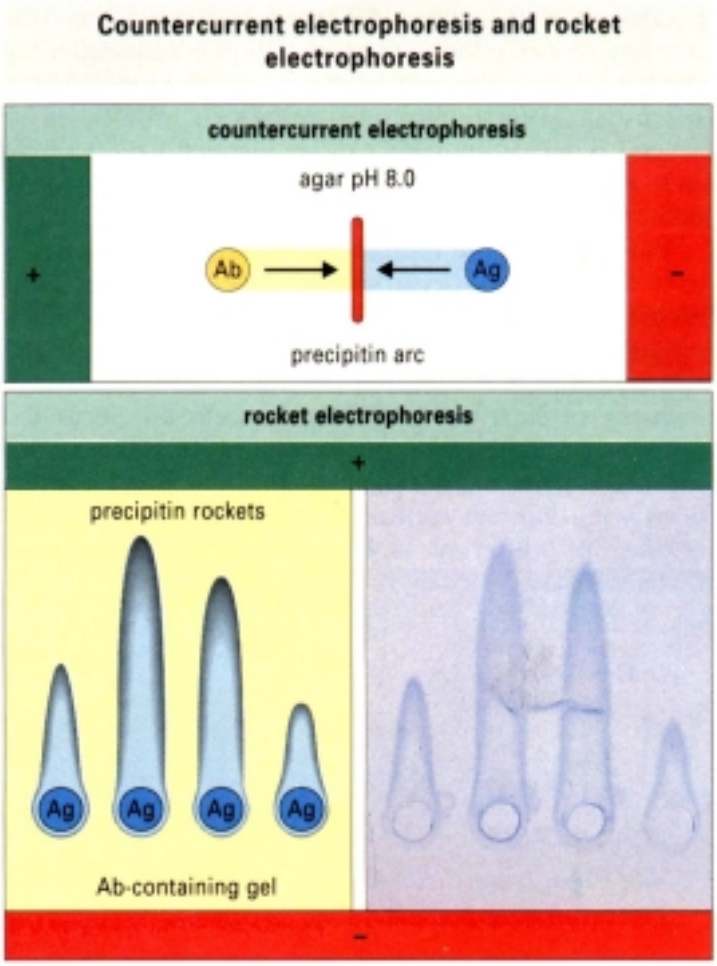
ข. Gel diffusion เมื่อหยุด electrophoresis เติม antiserum ลงในร่อง B (trough) ทิ้งไว้ข้ามคืนให้แอนติเจนและแอนติบอดีกระจายเข้าหากัน เกิดเป็นเส้นตะกอนตามตำแหน่งต่างๆ ของโปรตีนในซีรั่มที่ได้ถูกแยกออกก่อนแล้วด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ถ้าใช้ antihuman sera ใส่ในร่องจะเกิดเส้นมากมาย ดังภาพที่ 8-11 แต่ถ้าใส่เฉพาะ anti-IgG ในร่อง B ก็จะเกิดเฉพาะเส้นตะกอนของ IgG ดังนี้เป็นต้น



ภาพที่ 8-11 Immunoelectrophoresis แสดงโปรตีนที่ถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วทำปฏิกิริยากับ antiserum เกิดเป็นเส้นตะกอน

Electroimmunodiffusion (EID หรือ Laurell's technic)

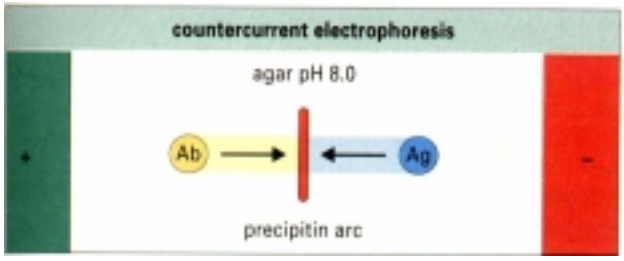
ใช้หาปริมาณโปรตีนหรือแอนติเจนที่มีจำนวนน้อยในน้ำเนื้อของร่างกาย (body fluid) เช่นการหาระดับ complement ในน้ำลาย น้ำไขสันหลัง ซึ่งใช้วิธี radial diffusion หาปริมาณไม่ได้ วิธีนี้คล้าย radial diffusion คือผสม antiserum ลงในวุ้นแล้วเทบนแผ่นกระจก เจาะหลุมในวุ้นสำหรับใส่แอนติเจนแต่มีพิเศษออกไปอีก คือต้องผ่านกระแสไฟฟ้าแรงสูงเป็นเวลาหลายชั่วโมง ปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่น้อย ๆ จึงจะทำปฏิกิริยากับ antiserum ในวุ้นเห็นเป็นเส้นตะกอนรูปกรวยตามแรงดึงของกระแสไฟฟ้า เราวัดความยาวของเส้นตะกอนรูปกรวยจากจุดกึ่งกลางหลุมถึงยอดกรวย แล้วหาปริมาณแอนติเจนได้จาก standard curve



ภาพที่ 8-12 แสดงเทคนิคของ Laurell หรือ EID

Counter-immunoelectrophoresis (CIE) หรือ Immunoelectroosmophoresis (IEOP)

เป็นวิธีที่ใช้ electrophoresis ตรวจหาสารบางอย่างในซีรั่มเช่น HB_sAg (เกี่ยวข้องกับ serum hepatitis) และ fetoglobulin (เกี่ยวข้องกับมะเร็งตับ) เป็นต้น วิธีนี้ใช้ได้รวดเร็วและมีความไวสูง โดยจัดให้แอนติเจนและแอนติบอดีวิ่งสวนทางเข้ามาพบกันบนกระจกที่มีวุ้น ที่อยู่ในสนามไฟฟ้า เกิดเป็นเส้นตะกอนให้เห็นได้ การที่แอนติเจนกับแอนติบอดีจะวิ่งสวนทางในสนามไฟฟ้า จะต้องจัดดังภาพที่ 8-13

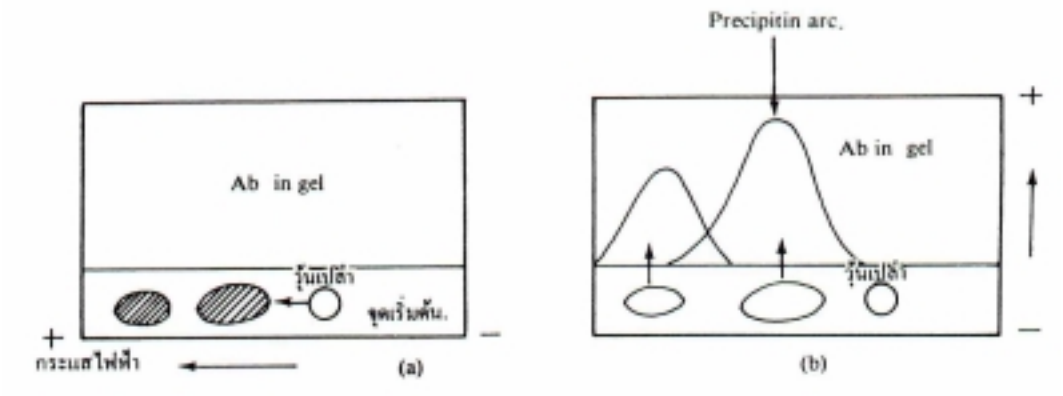


ภาพที่ 8-13 แสดง Counter-immunoelectrophoresis (CIE)

Two-dimensional immunoelectrophoresis (Bidimensional electrophoresis in antibody containing gels)

1. เริ่มให้สารที่ต้องการจะวิเคราะห์วิ่งจากขั้วลบไปบวกในวุ้นเปล่าตามแผนภาพที่ 8-13

2. กลับทางให้สารวิ่งเข้าสู่วุ้นที่มีแอนติบอดีในด้านที่ตั้งฉากกันจะเกิดเส้นโค้งของตะกอนขึ้นตามภาพที่ 8-13



ภาพที่ 8-14 แสดง two-dimensional immunoelectrophoresis

การทดสองที่ใช้ปฏิกิริยาการรวมกลุ่ม (Agglutination)

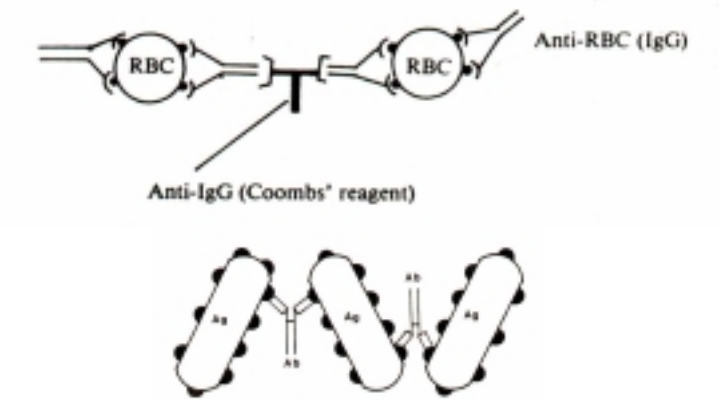
เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับ particulate antigen เช่น แบคทีเรีย เม็ดเลือดแดง หรือแอนติเจนที่เกาะบน synthetic particle ทำให้เกิดการรวมกลุ่มขึ้น

กลไกของปฏิกิริยาการรวมกลุ่ม

ใช้หลักการแบบเดียวกับปฏิกิริยาการตกตะกอนแต่ผลเสียที่เกิดจากปริมาณแอนติเจนมากเกินไปไม่ค่อยมี เนื่องจากแอนติเจนมีขนาดใหญ่ ปฏิกิริยาต้องการ electrolyte ที่พอดี และ pH ที่เป็นกลาง ถ้า electrolyte มากไป จะมีผลต่อประจุบนตัวแบคทีเรียทำให้เกิดการรวมกลุ่มได้เองโดยไม่ต้องมีแอนติบอดีในทางตรงกันข้ามถ้า electrolyte น้อยไปคือน้อยกว่า 10^{-3}M จะทำให้ไม่เกิดการรวมกลุ่ม

การปั่น การเขย่า และอุณหภูมิที่พอเหมาะจะทำให้เกิดการรวมตัวเร็วขึ้น และถ้าเราแช่หลอดแก้วที่มีส่วนผสมของ Ag-Ab ให้ระดับน้ำในหลอดแก้วสูงกว่าในอ่างน้ำอุ่น จะทำให้มี convection current เกิดการวนเวียนของโมเลกุลในหลอดทำให้มีการกระทบกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมากขึ้น เป็นการช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาดีขึ้น

Particle ที่เป็นเม็ดเลือดหรือแบคทีเรียมักจะมีประจุลบเมื่อแขวนตัวอยู่ในน้ำยา ทำให้เกิดปฏิกิริยาผลักห่างจากกัน ซึ่งทำให้รวมตัวกันยาก ในกรณี IgG การรวมกลุ่มเกิดได้ยากกว่า IgM เพราะ “แขนทั้งสองของ IgG อาจจะยึดอยู่กับแบคทีเรียตัวเดียวโดยไม่มีการเชื่อโยง



ภาพที่ 8-15 a) การรวมกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่มี Anti-IgG เป็นตัวเชื่อม b) การรวมกลุ่มของแบคทีเรีย

สารที่ช่วยให้ IgG ทำปฏิกิริยารวมกลุ่มได้ดีขึ้น

1. ใช้ 10-20% bovine serum albumin หรือ dextran ในความเข้มข้นสูง polyvinyls pyrrolidone, guaiacol หรือ polymers อื่นๆ ไม่ว่าจากธรรมชาติหรือที่สังเคราะห์ขึ้นมาใส่รวมลงไปในปฏิกิริยา

กลไกที่สารเหล่านี้ทำให้เกิดรวมตัวของแอนติเจนและแอนติบอดีนั้นไม่ทราบแน่นอน แต่อาจเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงประจุในตัวกลางและของแอนติเจนหรือแอนติบอดีทำให้โมเลกุลเข้ามาชิดกันขึ้น นอกนั้นอาจเกี่ยวกับ colloid osmotic pressure ภายนอกเซลล์หรือการดูดซึมและเชื่อมโยงของ polymers บนเซลล์

2. การใช้ proteolytic enzymes เช่น papain กับ RBC ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของผิวเซลล์และลดประจุบนผิวเซลล์ด้วย

3. ใช้ anti-immunoglobulin เช่น anti-human IgG เป็นตัวเชื่อมระหว่าง human IgG ดังตัวอย่างของการทำ Coombs' test (anti-globulin test) (ภาพที่ 8-15)

ประโยชน์ของปฏิกิริยาการรวมกลุ่ม

1. พิสูจน์และแยกชนิดของแบคทีเรียหรือเม็ดเลือดแดง โดยดูการรวมกลุ่มของสิ่งเหล่านี้กับ anti-serum ที่จำเพาะใช้ร่วมกับการดูรูปร่างลักษณะปฏิกิริยาเคมี และคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของแบคทีเรียทำให้ได้ผลเร็วและถูกต้องยิ่งขึ้น

2. หาแอนติบอดีโดยใช้แอนติเจนที่เราทราบชนิดมาทำปฏิกิริยาด้วย เป็นประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่เกิดจากพวกแบคทีเรียแกรมลบ เช่น salmonells, brucella เป็นต้น การตรวจหาแอนติบอดีเมื่อพบหรือไม่พบ ต้องใช้หลักการของ primary และ secondary immune response เข้าช่วยแปลผลและโดยทั่วๆ ไปจะถือว่าการเปลี่ยนแปลงของ Ab titer อย่างน้อยสี่เท่าตัวเป็นสิ่งสำคัญที่แสดงถึงว่าโรคกำลังคุกคามอยู่

Antibody titer

คือความเจือจางของซีรั่มอันสุดท้ายหรือสูงสุดที่แสดงปฏิกิริยาที่ชัดเจน (เห็นด้วยตาเปล่าหรือแว่นขยาย) ดังตัวอย่างการอ่าน titer ตามตาราง

ตารางที่ 8-5 การทำ serial dilution ของ serum เพื่อหา titer

Dilute serum	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Dilute antigen	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Final dilute	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Agglutination	++++	++++	+++	+++	++	++	-

ในกรณีที่นับว่าแอนติเจนมีส่วนทำให้เจือจางจะได้ titer 640 dil. (1:640) บางครั้งไม่นับปริมาณแอนติเจนที่ใส่เข้าไปจะได้ titer 320 dil. (1:320)

Prozone phenomenon

เป็นปรากฏการณ์ของปฏิกิริยาระหว่าง Ag-Ab ที่เกิดขึ้นผิดธรรมดา คือเมื่อมีแอนติบอดีสูงจะไม่เกิดปฏิกิริยา แต่จะเกิดเมื่อถูกทำให้เจือจางลงมาดังตัวอย่างในตารางที่ prozone phenomenon พบได้จากแอนติบอดีของ brucella เสมอ และพบได้บ้างจากแอนติบอดีต่อ salmonella กับ thyroid Ab

ตารางที่ 8-6 แสดงลักษณะของ Prozone phenomenon

Dilute serum	1:80	1:160	1:3200	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
Agglutination	-	-	-	-	++	++	++

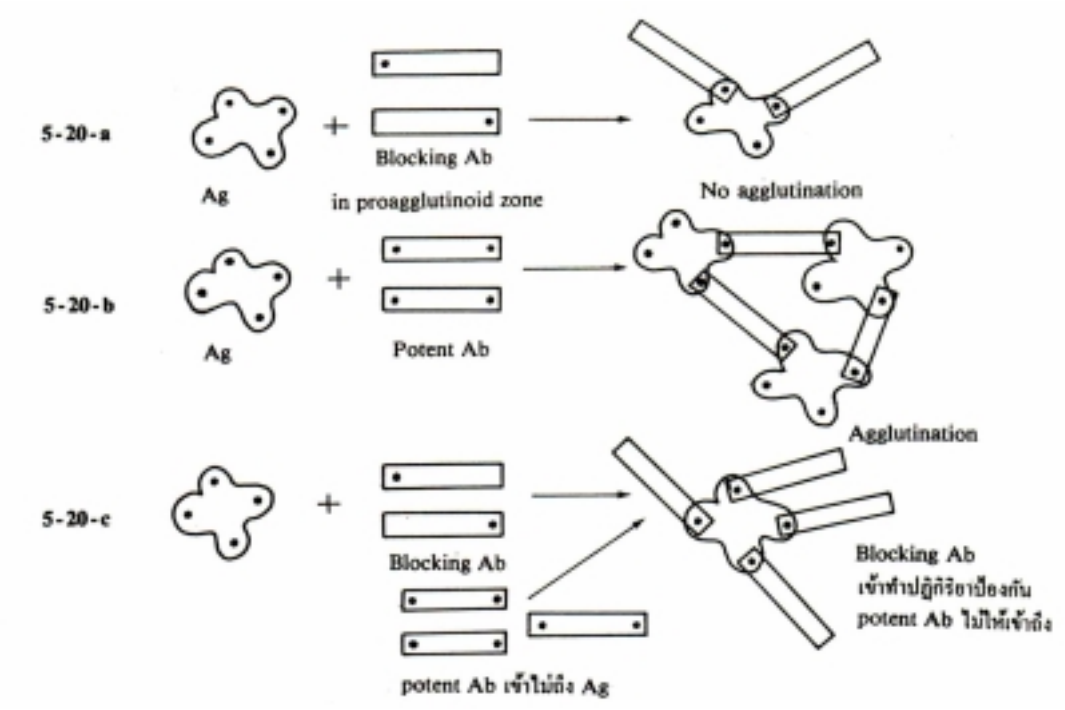
ปรากฏการณ์นี้ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากอะไรแต่อาจอธิบายได้ตามเหตุผลต่าง ๆ ดังนี้

1. เป็นปฏิกิริยาในขณะที่มีแอนติบอดีเป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับแอนติเจนทำให้ไม่มี cross linking

2. เป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเช่นจากความร้อน

3. ถูกรบกวนจากสารพวก colloid

4. เกิดจาก blocking Ab (univalent, incomplete antibodies) เช่นพวก IgG ที่มาแย่งทำปฏิกิริยาโดยไม่มี cross linking และกันแอนติบอดีอื่น ๆ ไม่ให้ทำปฏิกิริยาดังภาพที่



ภาพที่ 8-16 แสดง blocking Ab จำพวก IgG ขัดขวางปฏิกิริยาการรวมกลุ่ม

ชนิดของปฏิกิริยาการรวมกลุ่ม

1. Direct agglutination
   - 1.1 Simple (classic)
   - 1.2 Hydrophilic enrichment ใส่สารต่าง ๆ เข้าไป
   - 1.3 Enzyme augmentation
2. Ag-coated particles (passive agglutination หรือ indirect agglutination)
   - 2.1 ใช้วิธีการดูดซับ (absorbed) หรือเคลือบโดยตรง
   - 2.2 ใช้ปฏิกิริยาเคมีช่วย (covalently linked)
3. Ab-coated particles (reverse passive agglutination)
4. Antiglobulin-mediated agglutination เช่น Coombs' test
5. Agglutination inhibition

Passive agglutination (indirect agglutination)

เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่อยู่ในสารละลายซึ่งเกาะอยู่บน inert particles กับแอนติบอดีที่จำเพาะแล้วชักนำให้ particle นั้นรวมตัวแบบ agglutination

Inert particles ควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. ไม่ทำปฏิกิริยารวมกลุ่มกับแอนติบอดีที่ใช้หา
2. มีขนาดเท่า ๆ กัน และแขวนตัว ในสารละลาย (suspension) ที่สม่ำเสมอไม่รวมตัวกันเอง

Inert particles ที่นิยมใช้กันคือ

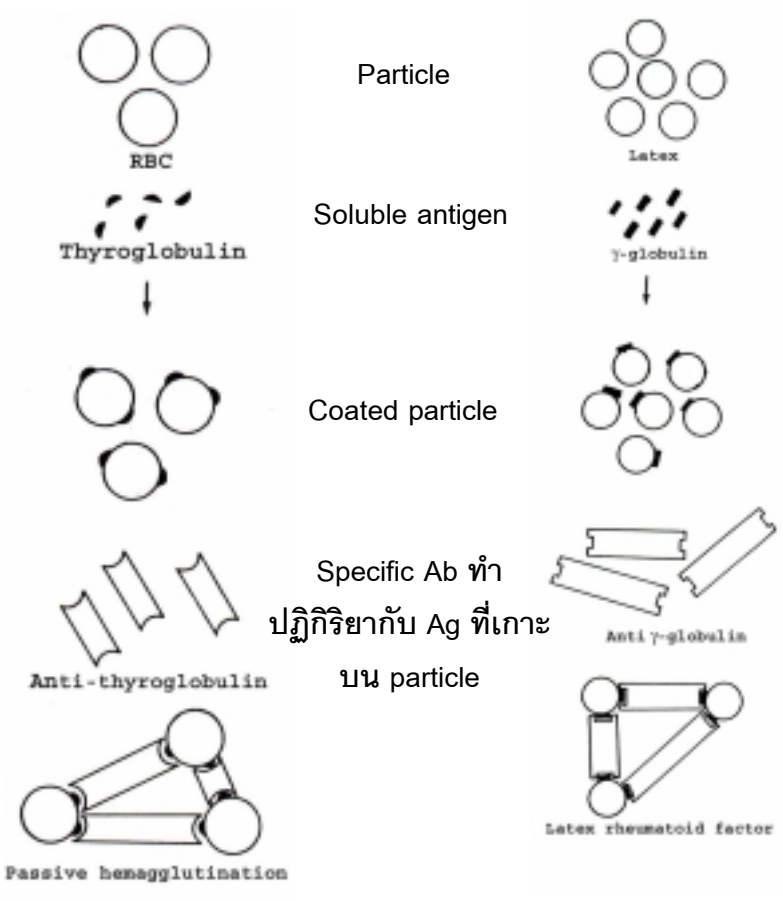
1. เม็ดเลือดของแกะ โดยที่ซีรั่มที่จะนำมาทดสอบต้องนำไปดูดซับ (absorb) ด้วยเม็ดเลือดแดงแกะ เพื่อกำจัดแอนติบอดีที่มีต่อเม็ดเลือดแดงแกะที่มีอยู่ตามธรรมชาติทิ้งเสียก่อน

2. สารสังเคราะห์ซึ่งเป็น polymer ของ polystyrene latex เรียก latex particles (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.81 m)

3. bentonite ได้มาจาก silicaceous earth mined (aluminium silicate)

เม็ดเลือดแดงดูดซับ (absorb) polysaccharide Ag ได้โดย natural bonding บนเม็ดเลือดแดงเอง แต่ถ้าจะใช้แอนติเจนที่เป็นโปรตีนมา absorb ต้องผสมเม็ดเลือดแดงกับ tannic acid ให้เป็น tanned RBC ก่อน แล้วจึงเอา protein Ag มาดูดซับ นอกจาก tannic acid อาจใช้สารเคมีอื่นๆ เช่น bisdiazobenzidine reagent และ glutaraldehyde เป็นต้น ส่วน latex และ bentonite ดูดซับ (absorb) ได้ทั้งแอนติเจนที่เป็นโปรตีนและ polysaccharide ได้โดยตรง

ตัวอย่างปฏิกิริยานี้ได้แก่การตรวจหา thyroid Ab โดยวิธี passive hemagglutination และการหา rheumatoid factor ที่ใช้ latex particle เคลือบด้วย γ-globulin (ภาพที่ 8-15)

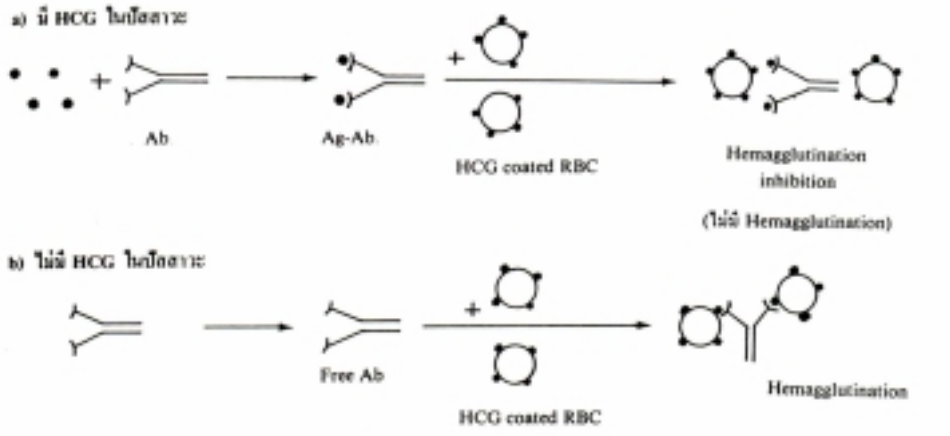


ภาพที่ 8-17 แสดงปฏิกิริยา passive hemagglutination และ passive agglutination

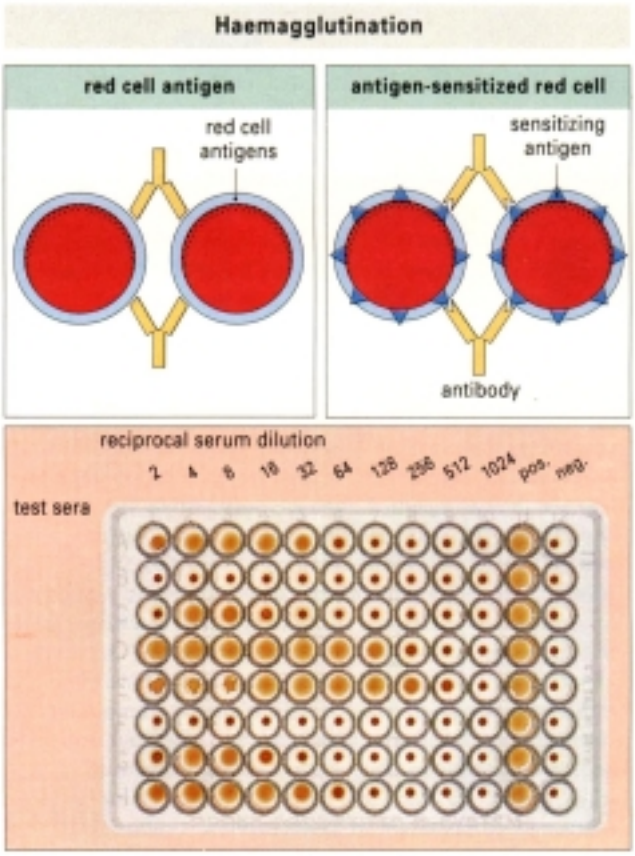
Hemagglutination inhibition

เป็นวิธีที่มีความไวสูง และมีความจำเพาะใช้ตรวจหาแอนติเจนปริมาณน้อย ๆ ในเลือดและน้ำอื่น ๆ ใช้หลักการที่ homologous antigen จะยับยั้งปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของ antigen-coated RBC กับ specific Ab ดังตัวอย่างในภาพที่ 8-17

วิธีนี้ใช้ตรวจหาฮอร์โมน chorionic gonadotropin (HCG) ในปัสสาวะคนตั้งครรภ์ หา HB_sAg ในเลือด เป็นต้น



ภาพที่ 8-18 แสดงปฏิกิริยา hemagglutination inhibition

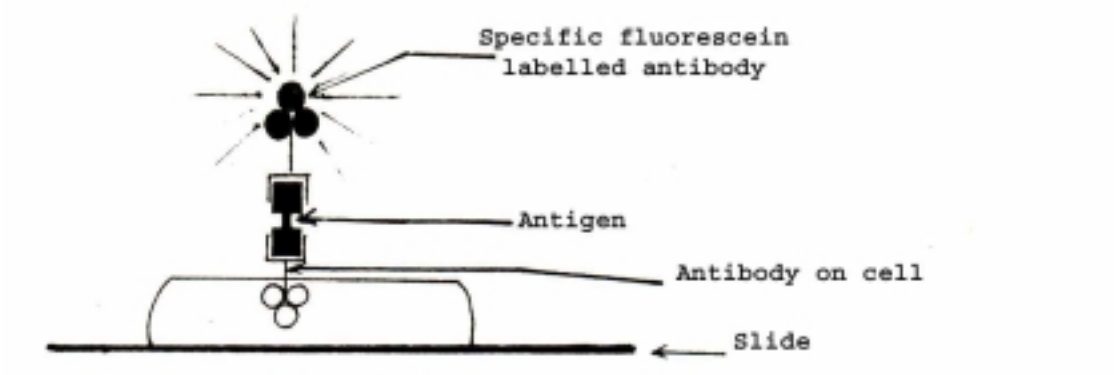


ภาพที่ 8-19 แสดงปฏิกิริยา hemagglutination inhibition

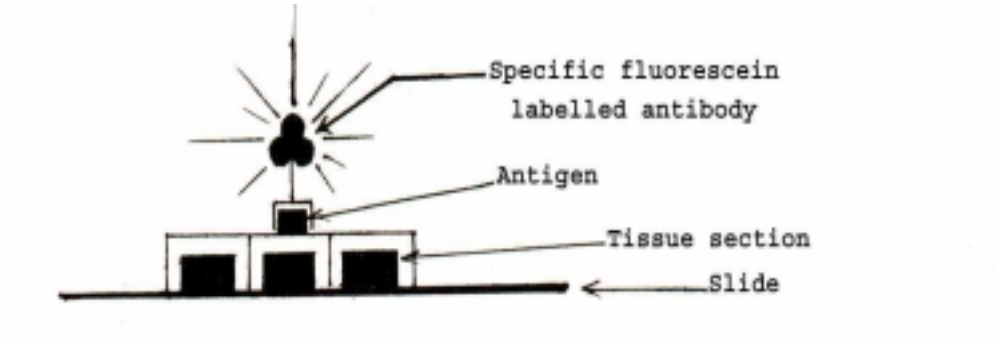
Immunofluorescent method

เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้สารเรืองแสงเข้ามาช่วยแสดงปฏิกิริยา เริ่มทำเป็นครั้งแรก โดย Coon ในปี ค.ศ.1941 มีวิธีการหลาย ๆ แบบดังนี้ :-

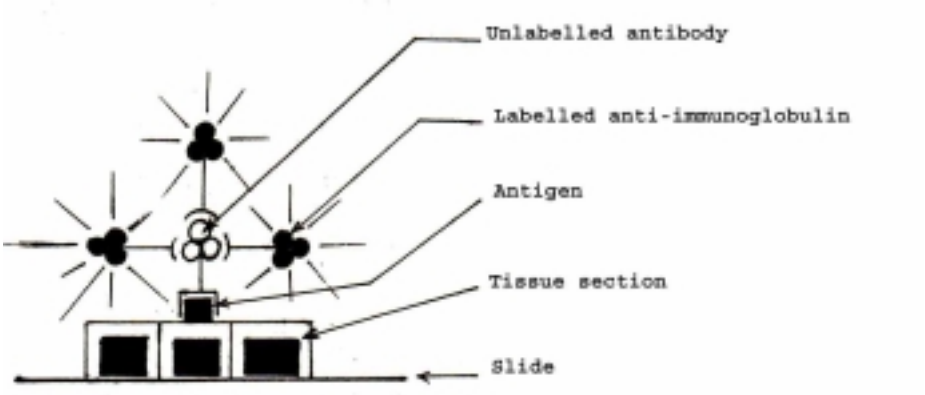
1. Sandwich's method



ภาพที่ 8-20 Fluorescent antibody test วิธี sandwich's method



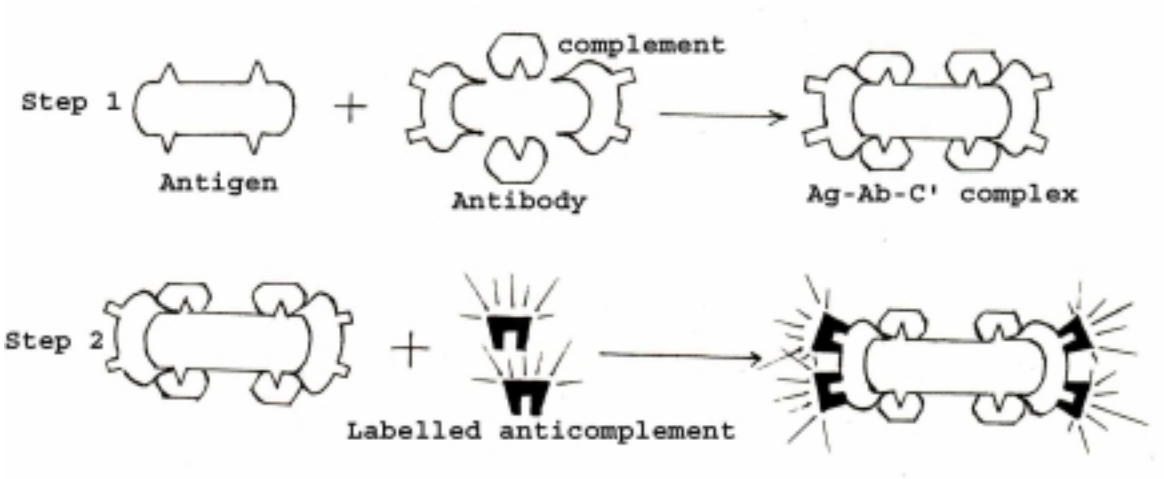
ภาพที่ 8-21 Fluorescent antibody test วิธี Direct



ภาพที่ 8-22 Fluorescent antibody test วิธี Indirect

2. Direct method (ภาพที่ 8-21) ใช้ตรวจหาแอนติเจนโดยใช้ specific Ab labelled ด้วยสารเรืองแสง (F)

3. Indirect method (ภาพที่ 8-22) ใช้ตรวจหาได้ทั้งแอนติเจนและ Ab conjugate เป็น species specific ทำกับสัตว์ชนิดใดต้องใช้แอนติบอดีต่อ Ig ของสัตว์ชนิดนั้น

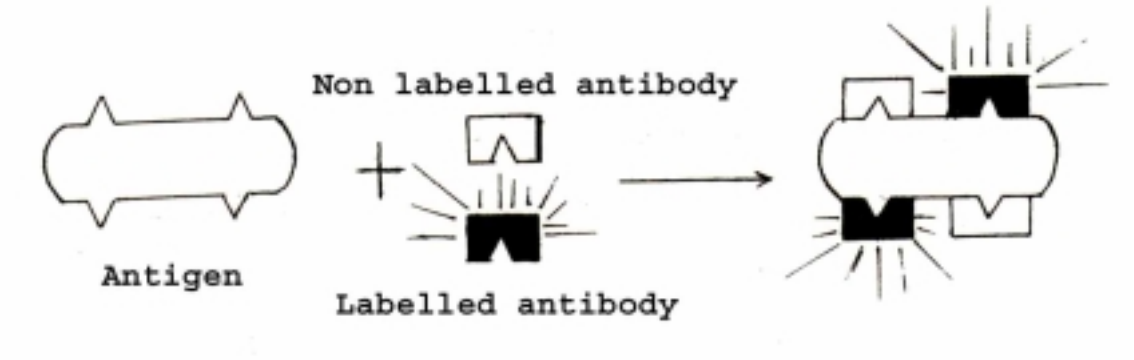


ภาพที่ 8-23 แสดง anticomplement method ในการย้อม immunofluorescence

4. Anticomplement method (ภาพที่ 8-23) ข้อดีตรงที่ anti-C เป็น non-species-specific ใช้ได้กับสัตว์ทุกชนิด

5. Inhibition method (ภาพที่ 8-24)

ใช้หลักที่ non-labelled Ab แย่งกันทำปฏิกิริยากับ labelled Ab



ภาพที่ 8-24 แสดง immunofluorescent inhibition technic

6. Delayed direct technic

นำเชื้อโรคที่เลี้ยงไว้ 6-8 ชั่วโมงเป็นแอนติเจนเอามาย้อมด้วย labelled specific Ab โดยวิธี direct method

7. Double antibodies technic

ใช้วิธีแบบเดียวกับ direct immunofluorescence แต่ย้อมด้วย conjugate 2 ครั้ง ซึ่งเป้นแอนติบอดีคนละชนิดกัน และติดฉลากด้วยสารเรืองแสงต่างชนิดกัน เช่นAbX กับ fluorecein isothiocyanate และ AbY กับ rhodamine เป็นต้น ทำให้สามารถตรวจหาแอนติเจน X และ Y ได้พร้อมกันในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ วิธีนี้มีประโยชน์ในการแสดงการสร้างสารหรือฮอร์โมนต่างชนิดกันภายในเซลล์ เช่นเซลล์ของ islet of Langerhans ในตับอ่อนเป็นต้น

Conjugate คือ labelled antibodies เช่น anti-human γ-globulin labelled หรืออาจเป็นแอนติบอดีตัวอื่นๆ และ anti-complement ต่างๆ ที่ติดฉลากด้วยสารเรื่องแสง เป็นต้น

สิ่งที่ควรทราบเกี่ยวกับ immunofluorescent method

1. สารเรืองแสงที่นิยมใช้คือ fluorescein isothiocyanate ซึ่งเรืองแสงเป็นสีเขียว

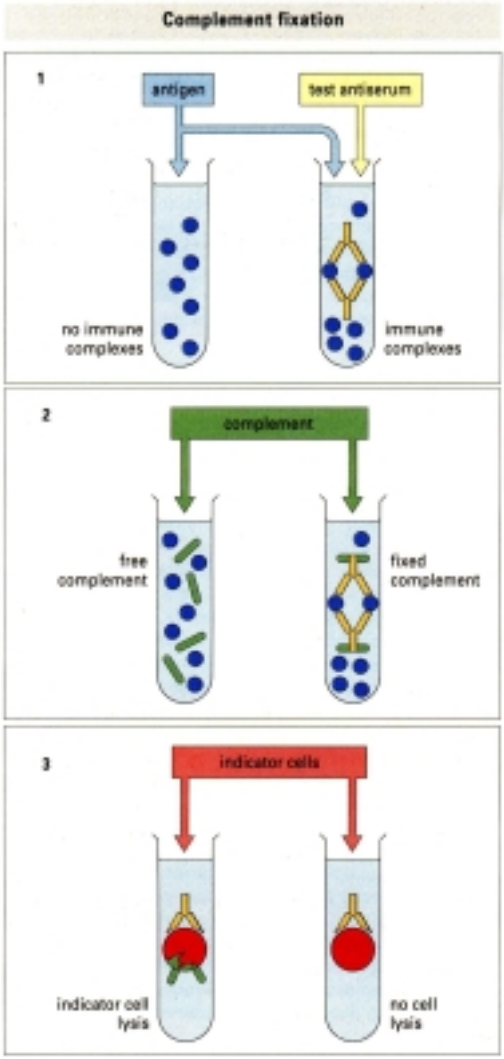
2. counter stain อาจใช้ rhodamine ซึ่งเรืองแสงสีแดง

3. เกี่ยวกับการเรืองแสงของเนื้อเยื่อที่ไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific fluorescence) และวิธีการกำจัด เช่นพวก collagen tissue มักติดสีเสมอ

4. ประโยชน์ที่ใช้มีมากมาย เช่น การใช้ indirect method ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อต่างๆ เช่นแอนติบอดีต่อ *T. pallidum* และการตรวจหา autoantibody ในซีรั่มต่างๆ และใช้ direct method หาว่ามีการเกาะติดอยู่ของโปรตีน พวก immunoglobulin, complement, fibrin และอื่นๆ บนเนื้อเยื่ออวัยวะหรือไม่ และใช้ตรวจพิเคราะห์จุลชีพต่างๆ

ปฏิกิริยาการตรึง complement (complement fixation test, CFT)

เมื่อแอนติเจนรวมตัวกับแอนติบอดีแล้วถ้ามี complement (C) อยู่ด้วย C จะถูกตรึง (fixed) อยู่กับ Ag.แอนติบอดีนั้น ซึ่งโดยทั่วๆ ไปจะรู้ได้ว่า C ถูกตรึง (fix) หรือใช้ไปในปฏิกิริยาของ Ag.แอนติบอดีแล้ว ก็ต่อเมื่อเราใช้ Ag.แอนติบอดีอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งจะต้องใช้ C ในการแสดงปฏิกิริยา เช่นเ เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่ (sensitized red cell) ซึ่งจะแตกออกได้ (hemolysis ถ้ามี C ในปฏิกิริยา เป็นต้น ปฏิกิริยา CFT แสดงได้เป็นขั้นๆ ดังภาพที่ 8-25



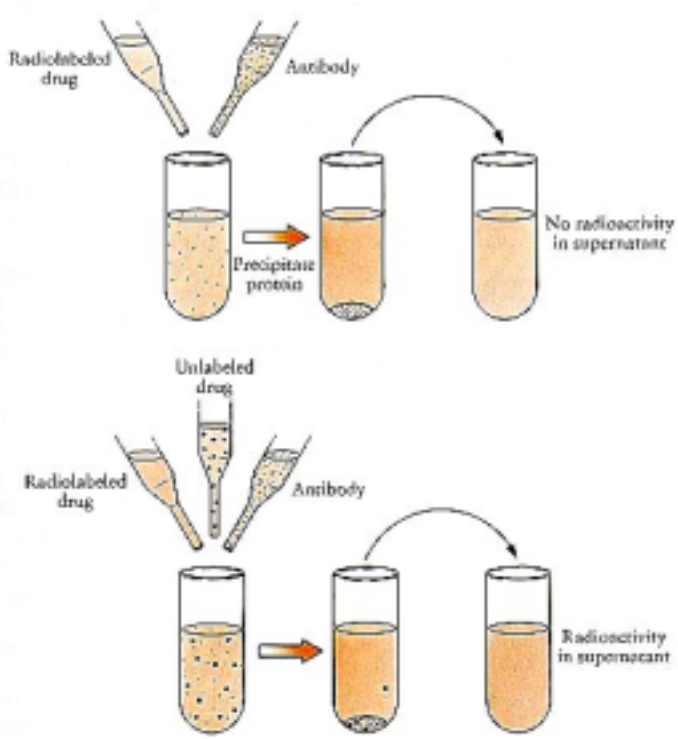
ภาพที่ 8-25 แผนภูมิของปฏิกิริยาการตรึง complement (CFT)

Radioimmunoassay (RIA)

เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่อาศัยการติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีมาช่วยในปฏิกิริยามีหลายวิธี คือ

Competitive binding technic วิธีนี้ใช้ตรวจหาแอนติเจนโดยการให้แอนติเจนที่ต้องการหาแย่งกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีดังแสดงในภาพที่ 8-26

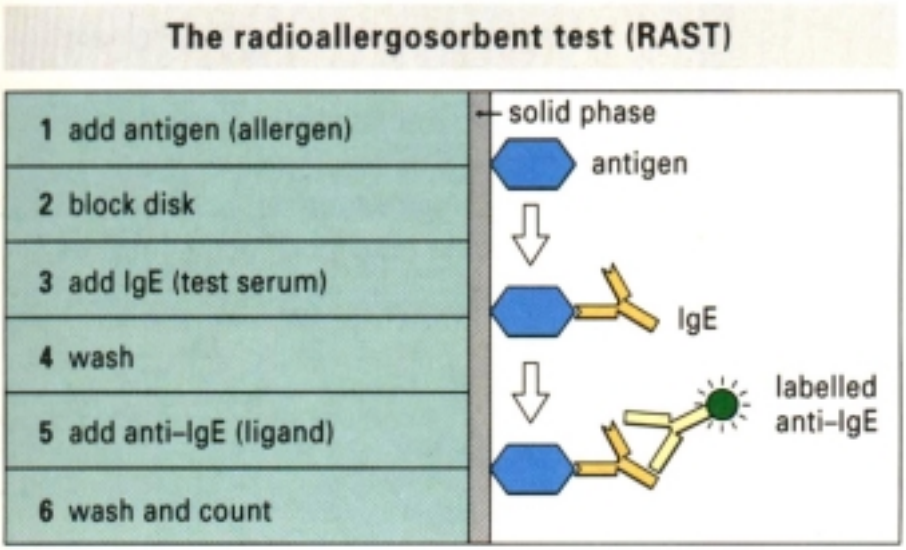
ถ้าไม่มีแอนติเจน (unlabelled Ag) ในสารที่เรากำลังหาแอนติบอดีก็จะจับกับ labelled Ag ที่ใส่เข้าไปทั้งหมด ทำให้ได้ Ag-Ab complex ที่มีสารรังสีอยู่มากขึ้น และโดยการสร้างกราฟมาตรฐานเมื่อใช้แอนติเจนที่รู้ปริมาณ จะสามารถหาปริมาณของแอนติเจนในสารที่เราต้องการจะหาค่าได้ (ภาพที่ 8-26)



ภาพที่ 8-26 แสดง competitive binding technic

Antibody binding capacity (solid phase radioimmunoassay)

เป็นการตรวจหาแอนติบอดีโดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่เกาะหรือเคลือบอยู่บนผิวของ solid phase เช่น plastic tube (polystyrene tube) หรือ immunoadsorbent เช่น cross-linked dextrans ซึ่งได้แก่ Sepharose หรือ Sephadex เป็นต้น แล้วเติม anti-immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีล้างส่วนเกินออก แล้ววัดปริมาณรังสี



ภาพที่ 8-27 แสดง antibody binding capacity

ตัวอย่างของการใช้ปฏิกิริยานี้ได้แก่การตรวจหา anti-DNA หรือการตรวจหา IgE antibodies ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ ซึ่งเรียก radioallergosorbent test (RAST) เป็นต้น

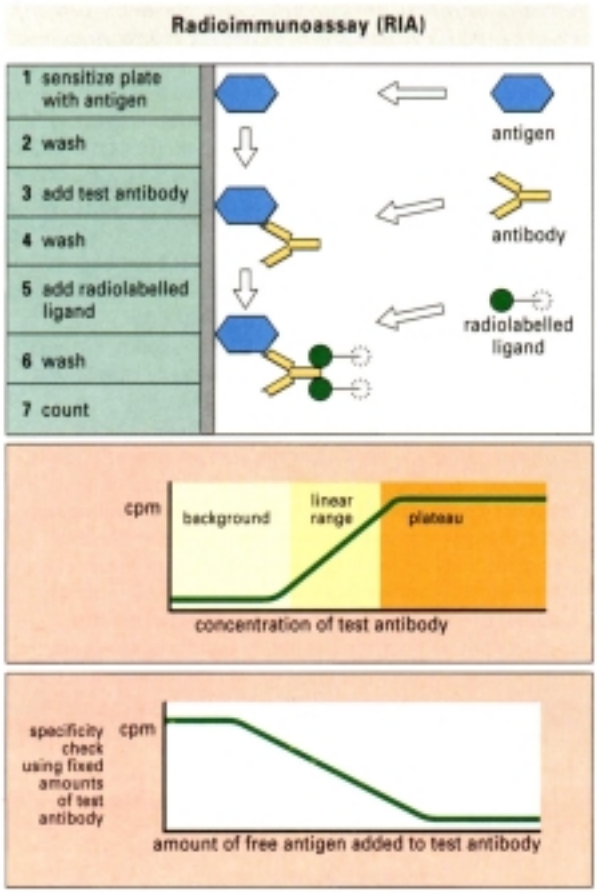
Antigen-binding capacity เป็นปฏิกิริยาระหว่าง labelled Ag กับแอนติบอดีแล้วแยก Ag-Ab complex ออกมา ตกตะกอนด้วย 50% saturated ammonium sulphate (Farr's technic) หรือตกตะกอนด้วย anti-immunoglobulin (anti-globulin coprecipitation technic) ดังแสดงในภาพที่

ประโยชน์ของ RIA

RIA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก สามารถตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้ถึง 10^{-12} g/ml. จึงนิยมใช้ในการตรวจหาปริมาณของฮอร์โมน, ยา,แอนติเจนและแอนติบอดีต่าง ๆ เช่นการตรวจหา IgE, anti DNA, Carcinoembryonic antigens, HB_sAg เป็นต้น

Ferritin-labelled antibody technic

Ferritin เป็นโปรตีนที่มีส่วนประกอบของสารเหล็ก มีคุณสมบัติทึบต่อแสงอิเล็กตรอน และไม่ทำให้แอนติบอดีเสียคุณสมบัติ ดังนั้นจึงใช้ Ferritin ติดฉลากกับแอนติบอดีแล้วทำปฏิกิริยากับแอนติเจนและใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตรวจหาตำแหน่งของแอนติเจนในเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้

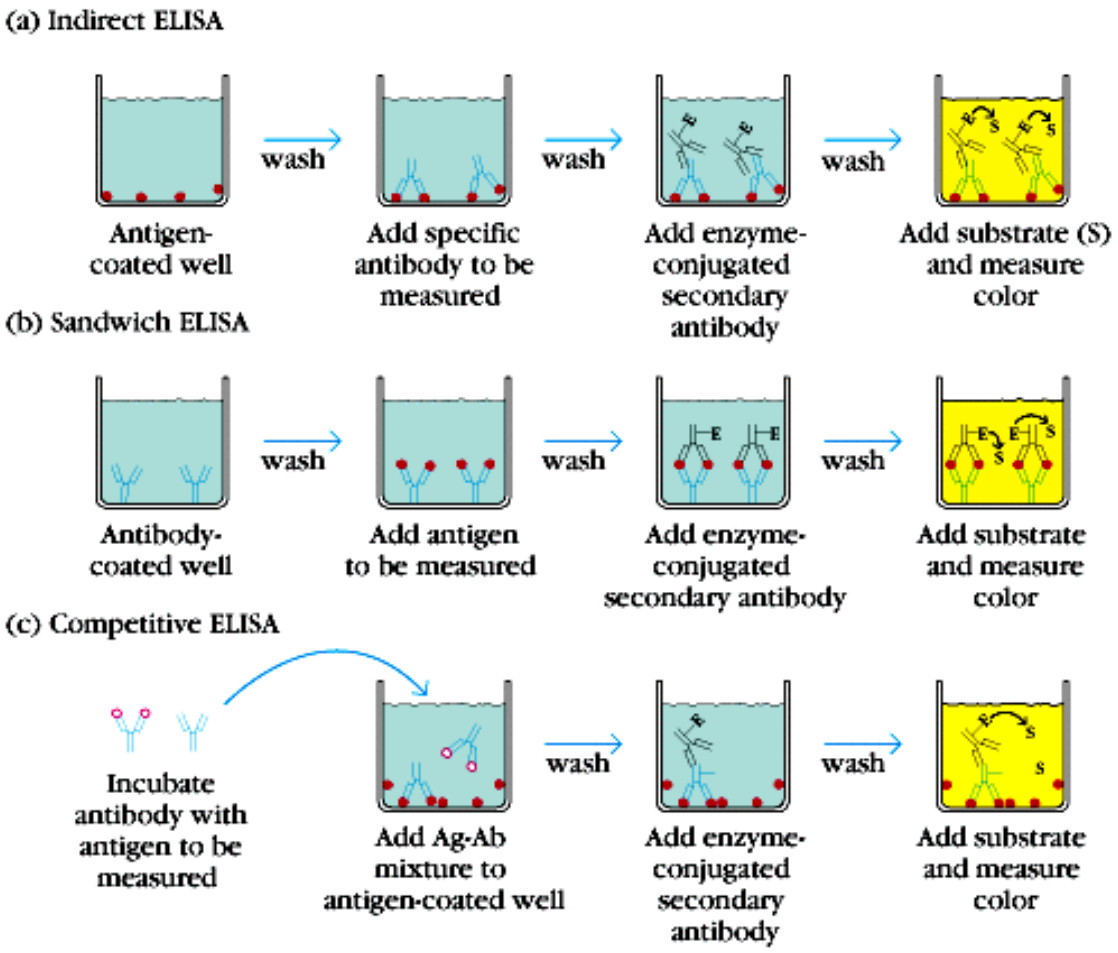


ภาพที่ 8-28 แสดงวิธีการของ antigen-binding capacity

Immunoenzymatic technic (Enzyme immunoassay)

เอนไซม์บางชนิดเมื่อรวมกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีไม่ทำให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเสียคุณสมบัติ เมื่อใส่ substrate ลงไปจะมีการย่อย substrate และเปลี่ยนสีให้เห็นได้ เช่นถ้าใช้ enzymes จาก horse radish peroxidase แทนสารเรืองแสงและเติม diaminobenzidine กับ hydrogen peroxide ในขั้นสุดท้ายจะเกิดสีดำ ซึ่งดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะมีประโยชน์เหมือนกับการใช้สารเรืองแสงและใช้หลักของ direct และ indirect technic เหมือนกัน นอกจากนี้ยังอาศัยหลักของ immunoassay ในการหาปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติบอดีโดยให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเกาะบนของแข็ง เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว จึงวัดสีที่เกิดขึ้นด้วย spectrophotoment หรือดูด้วยตาเปล่า เราเรียกวิธีการนี้ว่า enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ELISA มีหลายวิธีด้วยกันคือ

Double antibody sandwich method for microplate ELISA สำหรับการตรวจหาและวัดปริมาณของแอนติเจน



ภาพที่ 8-29 a) แสดง indirect method of ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดี b) แสดง double antibody sandwich method of ELISA ในการตรวจหาแอนติเจน c) แสดง competitive method of ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดี

Indirect method of ELISA สำหรับตรวจหาและวัดปริมาณของแอนติบอดี (ภาพที่ 8-29)

Competitive method of ELISA สำหรับตรวจหาและวัดปริมาณของแอนติบอดีหรือแอนติเจน (ภาพที่ 8-29)

ในกรณีที่จะตรวจหาแอนติเจน ใช้หลักการอันเดียวกันแต่ใช้แอนติบอดีเกาะติดกับ plate และใช้ enzyme-labelled Ag แทน

ข้อควรทราบเกี่ยวกับ ELISA

1. แอนติเจนหรือแอนติบอดี สามารถเกาะติดกับ solid phase บางชนิดแบบ passive adsorption. solid phase ที่ใช้ได้แก่สารจำพวก polystyrene, polyvinyl, nylon หรือ polypropylene เป็นต้น ซึ่งอาจอยู่ในรูปของหลอดแก้ว ลูกแก้ว disks หรือ microplate

2. Enzyme และ substrate ที่นิยมใช้ ได้แก่

Enzyme	Substrate
Horseradish peroxidase	O-phenylenediamine
Alkaline phosphatase	P- nitrophenyl phosphate

3. ELISA เป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก และวิธีทำไม่ยุ่งยากจึงได้มีการใช้อย่างกว้างขวางในการหาแอนติเจนและแอนติบอดีต่าง ๆ เช่น

- แอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส รา ปรสิต
- Autoantibodies เช่น anti DNA, rheumatoid factors, การหา circulating immune complexes ฯลฯ
- ตรวจหา oncofetal proteins เช่น alphafetoprotein
- การตรวจหาฮอร์โมนต่าง ๆ