**Original article**

# Reference Intervals for serum of 50% hemolytic complement (CH50) activity in Thai blood donors using the liposome immunoassay

**Kanthika Bootdee[1,*], Sompong Boonhai[2], Krittraporn Deesin[3], Vararat Putthong[1], Yadah Kaewopas[3], Kanthaporn Dityen[3], Niramol Thammacharoenrach[1], Asada Leelahavanichkul[1,3,4]**

*[1]Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand*
*[2]Antiserum and standard cell preparation section, National Blood Centre, The Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand*
*[3]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
*[4]Department of Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand*

## Abstract

***Background:*** For a proper clinical interpretation, it is advised to confirmed reference ranges for most of the tests in some countries due to a possible variation from ethnicity.

***Objective:*** This study aimed to define the reference range for complement measurement using the samples from Thai blood donors.

***Methods:*** This study was conducted from January to July 2021 at Chulalongkorn University, Bangkok Thailand. Serum levels of 50% hemolytic complement (CH50) activity, C3 and C4 in 180 donors (17 to 61 years old). CH50 was measured using liposome immunoassay, C3 and C4 were based on turbidimetry assay.

***Results:*** The normal values of CH50 in Thai population was 55.86 ± 9.02 units/ml. Meanwhile, the values of serum C3 and C4 were 134.67 ± 25.63 and 27.20 ± 8.96 mg/dl, respectively.

***Conclusion:*** The normal serum value of CH50 from the Thai healthy blood donors is 37.83 – 73.89 units/ml. The results of this research can be considered as a reference for Thai population, and may use in the laboratory clinical diagnosis and research.

***Keywords:*** Reference ranges, CH50, complement, Thai blood donor, liposome immunoassay.

*Correspondence to: **Kanthika Bootdee,** Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, The Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.
E-mail: kantika_ying@hotmail.com
**Received:** August 23, 2021
**Revised:** December 28, 2021
**Accepted:** January 25, 2022

**นิพนธ์ต้นฉบับ**

# การศึกษาค่าอ้างอิงของ 50% hemolytic complement (CH50) activity ในซีรัมของผู้บริจาคโลหิตชาวไทยด้วยหลักการ liposome immunoassay

กัญฐิกา บุตรดี[1], สมพงศ์ บุญให้[2], กฤตราภรณ์ ดีสิน[3], วรารัตน์ พุฒทอง[1], ญดา แก้วโอภาส[3], กัณฐาภรณ์ ดิษเย็น[3], นิรมล ธรรมาเจริญราช[1], อัษฎาศ์ ลีฬหวนิชกุล[1, 3, 4]

*[1]ฝ่ายจุลชีววิทยา, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, สภากาชาดไทย*
*[2]ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย*
*[3]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
*[4]ฝ่ายอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย*

## บทคัดย่อ

***เหตุผลของการทำวิจัย:*** การกำหนดช่วงอ้างอิงของโปรตีนในซีรัมในประชากรปกติของแต่ละประเทศเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการศึกษาและการแปลผลทางคลินิก

***วัตถุประสงค์:*** เพื่อกำหนดค่าช่วงอ้างอิงของ CH50 ในผู้บริจาคโลหิตชาวไทย

***วิธีการทำวิจัย:*** การศึกษานี้ดำเนินการตั้งแต่เดือนมกราคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2564 ในหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการตรวจวิเคราะห์ระดับซีรัมของ CH50, C3 และ C4 ของผู้บริจาคโลหิตชาวไทยจำนวน 180 ราย ที่มีอายุระหว่าง 17 ถึง 61 ปี การตรวจวัด CH50 ใช้หลักการ liposome immunoassay ส่วน C3 และ C4 ใช้หลักการ turbidimetry assay และใช้การคำนวณค่าอ้างอิงที่ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

***ผลการศึกษา:*** ผลของการทดสอบระดับ CH50 ในซีรัม ด้วยวิธี liposome Immunoassay (LIA) จากเลือดผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีชาวไทย คือ 55.86 ± 9.02 ยูนิต/มิลลิลิตร ในขณะที่ผลการทดสอบ C3 และ C4 คือ 134.67 ± 25.63 มิลลิกรัม/เดซิลิตร และ 27.20 ± 8.96 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ

***สรุป:*** ค่าอ้างอิงของ CH50 ในซีรัมของผู้บริจาคโลหิตมีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ดี คือ 37.83 - 73.89 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งผลลัพธ์จากการวิจัยนี้ถือได้ว่าเป็นข้อมูลอ้างอิงในประชากรชาวไทย สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการการวินิจฉัยทางคลินิก และงานวิจัย

***คำสำคัญ:*** ค่าอ้างอิง, CH50, คอมพลีเมนท์, ผู้บริจาคโลหิตชาวไทย, liposome immunoassay.

คอมพลีเมนท์เป็นกลุ่มไกลโคโปรตีนในน้ำเหลืองและโปรตีนบนผิวเซลล์ซึ่งมีมากกว่า 30 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 5 ของโปรตีนชนิดโกลบูลินในน้ำเหลือง โดยปกติองค์ประกอบส่วนใหญ่อยู่ในสภาพที่ไม่ทำงาน (proenzyme หรือ zymogen) เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสมจะเกิด proteolytic cleavage เป็น active enzyme แล้วกระตุ้นต่อเนื่องกันเป็นขั้นน้ำตก (cascade activation) ผลจากการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เกิดการแตกออกของคอมพลีเมนท์แต่ละตัว ซึ่งทำให้เกิดผลลัพธ์ต่าง ๆ กันไป[1] คอมพลีเมนท์จัดเป็นส่วนหนึ่งของภูมิต้านทานแต่กำเนิด (innate immunity) ซึ่งสามารถตอบสนองต่อจุลชีพก่อโรคและสิ่งแปลกปลอมบางชนิดทันทีและยังมีส่วนช่วยเหลือการทำงานของภูมิต้านทานจำเพาะ (adaptive immunity) โดยจัดเป็นหนึ่งใน effector mechanism ของแอนติบอดีและช่วยส่งเสริมการตอบสนองของ B lymphocyte ต่อแอนติเจนอีกด้วย[2] คอมพลีเมนท์จัดเป็นโปรตีนที่ไม่ทนต่อความร้อน ถูกทำลายหากได้รับความร้อน 56 $^{0}$C เป็นเวลา ประมาณ 30 นาที หรือ ที่ 37 $^{0}$C นาน 2 - 3 ชั่วโมง นอกจากนั้นคอมพลีเมนท์ยังมีค่าครึ่งชีวิตในร่างกายสั้น อนึ่งปริมาณของส่วนประกอบคอมพลีเมนท์แต่ละตัวในร่างกายนั้นไม่แน่นอน โดยมีปัจจัยหลายอย่างส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคอมพลีเมนท์แต่ละตัว[3 - 4] อาทิเช่น 1) ภาวะคอมพลีเมนท์ถูกสร้างน้อยลง เช่น โรคตับวาย ผู้ป่วยหนักที่ใกล้เสียชีวิต ผู้ที่อยู่ในภาวะช็อค 2) คอมพลีเมนท์ถูกสร้างมากขึ้น เช่น โรคติดเชื้อและโรคที่มีการอักเสบต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของไซโตไคน์ต่าง ๆ ที่สำคัญได้แก่ interleukin-6 (IL-6), tumor nerosis factor alpha (TNF-$\alpha$) และ interferon gamma ($\gamma$-IFN) ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการสร้าง acute phase protein และคอมพลีเมนท์เพิ่มมากขึ้น และ 3) การมีอัตราการทำลายของคอมพลีเมนท์เพิ่มขึ้น เช่น immune complex diseases, disseminate intravascular coagulation (DIC) เป็นต้น

ค่าอ้างอิงของ CH50 อาจแตกต่างกันในแต่ละประชากร ข้อมูลเหล่านี้จำเป็นสำหรับการวิจัยและการวินิจฉัยทางคลินิกในทุกประชากร[5] การกำหนดค่าปกติของคอมพลีเมนท์ในซีรัมถือเป็นหนึ่งในวิธีการวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันและโรคติดเชื้อ ระดับของคอมพลีเมนท์อาจแตกต่างกันไปตามภูมิภาคทางภูมิศาสตร์ที่หลากหลาย เนื่องจากเพศและความแตกต่างทางเชื้อชาติ แม้ว่าโดยทั่วไปแล้วความแตกต่างเหล่านี้ไม่มีนัยสำคัญ แต่บางครั้งความรู้เกี่ยวกับชาติพันธุ์ที่ละเอียดอ่อนเหล่านี้ก็มีความสำคัญสำหรับการอธิบายทางคลินิก[6] ปัจจุบันการตรวจ complement ชนิด CH50 ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ได้เปลี่ยนมาใช้หลักการ liposome immunoassay แทนวิธี 50% hemolytic complement activity เนื่องมาจากสารเคมีบางชนิดที่ใช้ในการทดสอบนี้ไม่สามารถนำเข้าจากต่างประเทศได้ และมีวิธีการทดสอบที่ค่อนข้างจะยุ่งยาก โดยค่าปกติของ CH50 ด้วยวิธี liposome immunoassay นี้ได้นำมาจากการศึกษาเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพปกติในสหราชอาณาจักร จำนวน 120 ราย[7] อย่างไรก็ดีระดับการทำงานของคอมพลีเมนท์ในคนปกติอาจมีความแตกต่างกันตามเชื้อชาติ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อกำหนดค่าช่วงอ้างอิงของ CH50 ในประชากรชาวไทย โดยหลักการ liposome immunoassay โดยคาดหวังว่าแพทย์สามารถนำผลที่ได้มาวินิจฉัยโรคในประชากรไทยได้อย่างถูกต้อง และจะเป็นประโยชน์สูงสุดสำหรับผู้ป่วยชาวไทยที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลต่อไปในอนาคต

## วัสดุและวิธีการ

### *กลุ่มตัวอย่าง*

การเลือกตัวอย่างซีรัมของผู้บริจาคโลหิตมีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ดี จำนวน 180 ราย โดยมีข้อกำหนดตามเงื่อนไขดังนี้ ลักษณะของซีรัมต้องไม่มีปัจจัยให้เกิดความแปรปรวนของการทดสอบได้แก่ ซีรัมที่มีเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysed serum), ซีรัมขุ่นมีไขมัน (lipemic serum) และซีรัมเหลือง (icteric serum) โดยแบ่งเป็นกลุ่ม จำนวน 6 กลุ่ม ตามเพศและช่วงอายุ ประกอบด้วย ชาย อายุ 17 - 30 ปี จำนวน 13 ราย หญิง อายุ 17 - 30 ปี จำนวน 22 ราย ชาย อายุ 31 - 45 ปี จำนวน 54 ราย หญิง อายุ 31 - 45 ปี จำนวน 39 ราย ชาย อายุ 46 - 61 ปี จำนวน 31 ราย และหญิง อายุ 46 - 61 ปี จำนวน 21 ราย โดยทำการเก็บซีรัม ปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยซีรัมของผู้บริจาคโลหิตนี้ได้ผ่านการตรวจคัดกรองโรคติดเชื้อทางห้องปฏิบัติการ ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย แล้ว จากนั้นนำไปแช่ในตู้แช่แข็ง - 70 $^{0}$C ทันที การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เลขที่รับรองโครงการ NBC 15/2021

***วัสดุอุปกรณ์น้ำยา***

การศึกษานี้ใช้วัสดุ อุปกรณ์ ดังนี้ เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่น SPA PLUS (Birmingham, UK), เครื่องผสมสาร (Scientific Industries, USA), Automatic pipette ขนาด 200 - 1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany), Tips ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany), ชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำหรับการทดสอบ CH50 (Birmingham, UK), ชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำหรับการทดสอบ C3 (Birmingham, UK) และชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำหรับการทดสอบ C4 (Birmingham, UK)

***การตรวจหาปริมาณ CH50 ด้วยวิธี liposome immuno-assay***

การตรวจหาปริมาณ CH50 ด้วยวิธี liposome immunoassay โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่น SPA PLUS (Birmingham, UK) และชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำหรับการทดสอบ CH50 (Birmingham, UK) โดยน้ำยาตัวที่ 1 ประกอบด้วย แอนติเจน (Dinitrophenyl Ag : DNP Ag) เคลือบอยู่บนไลโปโซม ซึ่งภายในบรรจุด้วยเอนไซม์จีซิกพีดี (Glucose-6-phosphate dehydrogenase: G6PD) เติมซีรัมลงไปในน้ำยาตัวที่ 1 ซึ่งในซีรัมมีองค์ประกอบของคอมพลีเมนท์อยู่ในสภาพที่ไม่ทำงาน จากนั้นเติมน้ำยาตัวที่ 2 ประกอบด้วย แอนติบอดี (Anti dinitrophenyl: Anti DNP), substate (Glucose-6-phosphate: G6P และ Nicotinamide adenine dinucleotide: NAD) มีผลทำให้ Anti DNP จับกับ DNP Ag ที่อยู่บนผิวของ liposome ทำให้เกิด Ag-Ab complex ทำให้องค์ประกอบของคอมพลีเมนท์ทำงาน มีผลทำให้ liposome แตก เอนไซม์ G6PD ไหลออกมาเปลี่ยน NAD เป็น NADH วัดอัตราการดูดกลืนแสงจาก NADH ที่เกิดขึ้นแล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

***การตรวจหาปริมาณ C3 และ C4 ด้วยวิธี turbidimetry assay***

การตรวจหาปริมาณ C3 และ C4 ด้วยวิธี turbidimetry assay โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่น SPA PLUS (Birmingham, UK) และชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำหรับการทดสอบ C3, C4 (Birmingham, UK) โดยแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนท์ในน้ำยาจะทำปฏิกิริยากับคอมพลีเมนท์ที่อยู่ในซีรัมของตัวอย่างเกิดเป็น immune complexes เมื่อยิงลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ของเครื่อง ความเข้มของแสงจากหลอดอิเล็กตรอนที่ส่องผ่าน immune complexes จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของคอมพลีเมนท์ในซีรัม และคำนวณค่าความเข้มข้นโดยอัตโนมัติจากการเปรียบเทียบค่ามาตรฐานในเครื่อง

***การควบคุมคุณภาพของวิธีการทดสอบ***

การควบคุมคุณภาพภายในของการทดสอบ CH50, C3 และ C4 โดยการทำ control อย่างน้อย 2 levels ทุกวันที่ทำการตรวจวิเคราะห์ เพื่อประเมินความน่าเชื่อถือของประสิทธิภาพของน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ และสิ่งรบกวนปฏิกิริยา (interference) ที่พึงระวังมีดังนี้ 1) Bilirubin ที่ปริมาณสูงกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร 2) Haemoglobin ที่มีปริมาณสูงกว่า 5 กรัมต่อลิตร 3) Chyle ที่ปริมาณสูงกว่า 1,500 FTU และ 4) Aascorbic acid ที่ปริมาณสูงกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร เฉพาะการทดสอบ CH50

***การวิเคราะห์และนำเสนอข้อมูล***

ใช้ซอฟต์แวร์ graph pad prism เวอร์ชัน 7.0 (La Jolla, CA, USA) แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน (mean ± standard error (SD)) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้รับการตรวจสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว one-way analysis of variance (one-way ANOVA) ตามด้วยการวิเคราะห์ของ Tukey's analysis sinv Student's *t* - test สำหรับการเปรียบเทียบหลายกลุ่มหรือ 2 กลุ่มตามลำดับ และ $P < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลที่วิเคราะห์ได้มีการกระจายตัวแบบปกติหรือโค้งปกติ(normal distribution or gaussian curve) นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean, standard deviation; SD) หาช่วงค่า mean ± 3SD แล้วตัดค่าที่เกินช่วงดังกล่าวออก นำข้อมูลที่เหลือมาคำนวณ mean และ SD ซ้ำอีกครั้ง ค่าอ้างอิงที่ได้อยู่ระหว่าง mean ± 2SD

**ผลการศึกษา**

*ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัคร*

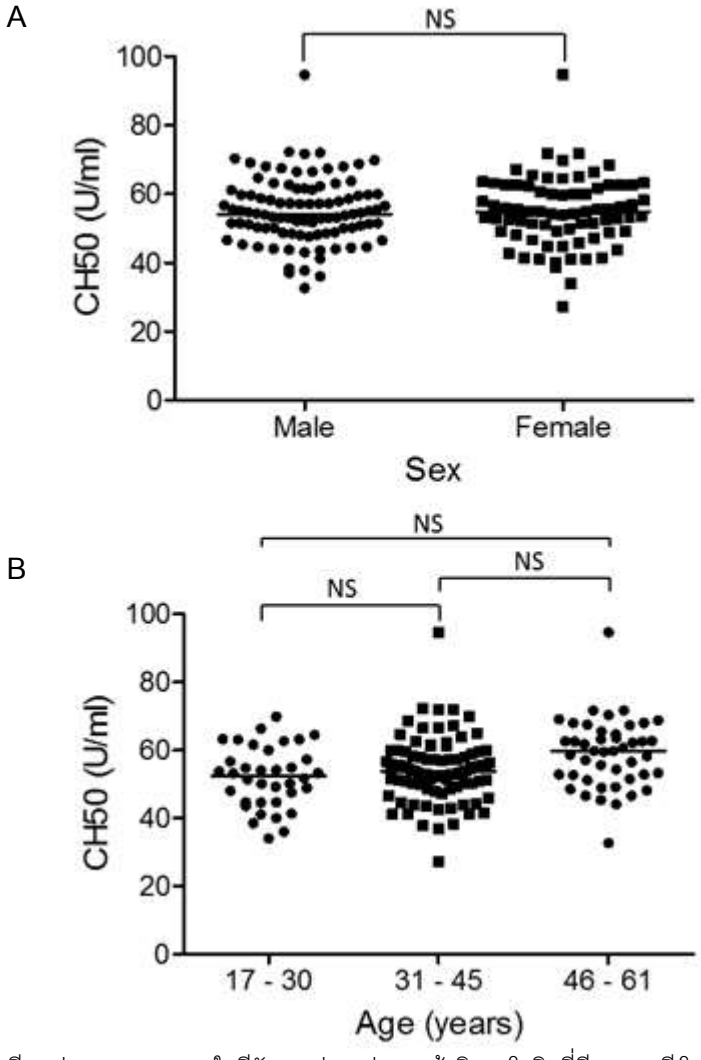
อาสาสมัครที่เข้าร่วมงานวิจัยในครั้งนี้ คือ ผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย ที่มีช่วงอายุตั้งแต่ 17 - 61 ปี (อายุเฉลี่ย 40.00 ± 10.48 ปี) เป็นเพศชาย 98 ราย (ร้อยละ 54) และเพศหญิง 82 ราย (ร้อยละ 46) รวมทั้งหมด 180 ราย โดยกลุ่มการทดสอบได้แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ประกอบด้วย ชาย อายุ 17 - 30 ปี จำนวน 13 ราย หญิง อายุ 17 - 30 ปี จำนวน 22 ราย ชาย อายุ 31 - 45 ปี จำนวน 54 ราย หญิง อายุ 31 - 45 ปี จำนวน 39 ราย ชาย อายุ 46 - 61 ปี จำนวน 31 ราย และหญิง อายุ 46 - 61 ปี จำนวน 21 ราย โดยที่ซีรัมที่นำมาทดสอบนี้ให้ผลลบต่อโรคติดเชื้อทั้งหมดที่ผ่านการตรวจตามมาตรฐานของศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย

***ผลการตรวจวิเคราะห์ CH50 โดยทำการตรวจควบคู่กับ C3 และ C4***

โดยผลการตรวจวิเคราะห์ ค่าอ้างอิงของปริมาณ CH50, C3 และ C4 ที่วัดได้ คือ 37.83 - 73.89 ยูนิต/มิลลิลิตร, 83.41 - 185.93 มิลลิกรัม/เดซิลิตร และ 9.27 - 45.13 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้สรุปค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มต่าง ๆ ไว้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และผลการเปรียบเทียบค่า CH50 (ยูนิต/มิลลิลิตร) ในซีรัมระหว่างกลุ่มของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีโดยแบ่งตามเพศและช่วงอายุต่าง ๆ นั้นแสดงให้เห็นว่าระดับค่าเฉลี่ย CH50 ในซีรัมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกลุ่มเพศและกลุ่มช่วงอายุที่แตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1

**ตารางที่** 1. ปริมาณซีรัม CH50, C3 และ C4 ของผู้บริจาคโลหิตชาวไทย

| Age | Gender | N | CH50 (U/ml) | | C3 (mg/dl) | | C4 (mg/dl) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| 17 - 30 year | Male | 13 | 53.68 | 6.55 | 141.78 | 25.15 | 27.69 | 10.80 |
| 17 - 30 year | Female | 22 | 52.62 | 9.23 | 127.73 | 26.04 | 25.26 | 10.94 |
| 31 - 45 year | Male | 54 | 54.45 | 7.47 | 136.87 | 24.33 | 26.56 | 6.37 |
| 31 - 45 year | Female | 39 | 56.06 | 10.06 | 129.01 | 30.62 | 27.41 | 10.02 |
| 46 - 61 year | Male | 31 | 59.75 | 10.87 | 136.46 | 23.54 | 27.57 | 8.23 |
| 46 - 61 year | Female | 21 | 59.24 | 6.63 | 139.79 | 20.33 | 29.67 | 10.58 |




**รูปที่** 1. แสดงการเปรียบเทียบค่า CH50 (U/ml) ในซีรัมระหว่างกลุ่มของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดี โดยแบ่งตามเพศ ได้แก่ เพศชาย (n = 98) และเพศหญิง (n = 82) **(A)** และช่วงอายุต่าง ๆ ได้แก่ อายุ 17 - 30 ปี (n = 35), อายุ 31 - 45 ปี (n = 93) และ อายุ 46 - 61 ปี (n = 52) **(B)** NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

## อภิปรายผล

การตรวจวัดระดับ CH50 เป็นดรรชนีสำคัญตัวหนึ่งที่สะท้อนถึงการทำงานด้าน classical pathway ของคอมพลีเมนท์ทุกตัว[8 - 9] คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค่าปกติของการทดสอบ CH50 ด้วยวิธี liposome Immunoassay (LIA) จากเลือดผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดี อายุตั้งแต่ 17 - 61 ปี จำนวน 180 ราย พบว่ามีช่วงค่าปกติ คือ 37.83 - 73.89 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับค่าปกติจากการศึกษาด้วยวิธีเดียวกันจากเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพปกติในสหราชอาณาจักร จำนวน 120 ราย[7] คือ 41.68 – 95.06 ยูนิต/มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าค่าเฉลี่ยเมื่อรวมกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในประชากรไทยจะมีช่วงที่แคบกว่าประชากรในสหราชอาณาจักร อาจเป็นเพราะจำนวนตัวอย่างที่ไม่เท่ากันและเชื้อชาติพันธุ์ที่แตกต่างกันซึ่งถือเป็นเรื่องสำคัญในการแปลผลทางห้องปฏิบัติการ[10 - 16] เนื่องจากการตรวจ CH50 เป็น functional assay ดังนั้น ควรตรวจระดับ C3 และ C4 เพื่อสนับสนุนว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์มีระดับคอมพลีเมนท์ที่อยู่ในช่วงปกติดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมของ 50% hemolytic complement activity (ค่าปกติจะอยู่ที่ 19.0 - 40.0 ยูนิต/มิลลิลิตร) ที่ใช้หลักการดูความสามารถของคอมพลีเมนท์ในซีรัมที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแกะที่มีแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงอยู่บนผิว (sensitized sheep erythrocyte) แตกไปร้อยละ 50 ซึ่งมีวิธีการทำค่อนข้างยุ่งยาก จะพบว่าค่าปกติของวิธี liposome Immunoassay (LIA) สูงกว่าและไม่สามารถนำมาใช้แทนกันได้ ค่าปกติจะแตกต่างกันไปตามวิธีที่ใช้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ จึงต้องเปรียบเทียบกับค่าปกติของห้องปฏิบัติการนั้น ๆ เสมอ ค่า CH50 ที่ปกติบ่งบอกว่า ระบบคอมพลีเมนท์ทั้งระบบทำงานได้เป็นปกติ อย่างไรก็ตาม ถ้าคอมพลีเมนท์แต่ละชนิดลดลงไปไม่ถึงร้อยละ 50 ค่า CH50 อาจปกติได้ ถ้าค่าของ CH50 ต่ำ แสดงถึงการมีคอมพลีเมนท์ตั้งแต่ 1 ชนิดขึ้นไปมีระดับลดลงมาก และควรทำการตรวจในขั้นตอนต่อไป ค่าคอมพลีเมนท์ที่สูงมักเกิดจากภาวะการอักเสบต่าง ๆ (inflammation) การตรวจ CH50 นับเป็นการตรวจคัดกรองที่ดีในผู้ป่วยที่สงสัยว่าอาจมี complement defects ค่า CH50 จะต่ำมากหรือเป็นศูนย์ ในผู้ป่วยที่มี primary complement deficiency ของ C1 ถึง C8 ส่วนผู้ที่มี C9 deficiency นั้น CH50 จะมีค่าประมาณ ร้อยละ 30 - 50 ของค่าปกติ อย่างไรก็ดีผลการตรวจด้วย functional assay อาจจะได้ค่าที่ต่ำกว่าความเป็นจริงหากพิจารณาจากส่วนประกอบของคอมพลีเมนท์ เนื่องจากมี anti complementary activity ในซีรัม หรือซีรัมที่นำมาทดสอบนั้นถูกทิ้งไว้นานเกินไปจนส่วนประกอบของคอมพลีเมนท์บางส่วนนั้นถูกทำลายด้วยความร้อน ดังนั้นการส่งตรวจ CH50 ต้องเจาะเลือดส่งทันทีและทางห้องปฏิบัติการต้องแยกซีรัมเก็บไว้ใน - 70 $^{0}$C เพื่อรักษาสภาพและลดการสลายตัวของคอมพลีเมนท์เสมอหากจำเป็นที่จะต้องเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาในภายหลัง ในการศึกษาค่าปกติของการทดสอบ CH50 ในครั้งนี้ ทางผู้ศึกษาได้ทำการควบคุมการเจาะเลือดและเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อการทดสอบ และทำให้ผลการศึกษาในครั้งนี้มีความถูกต้องน่าเชื่อถือมากที่สุด ในส่วนของข้อจำกัดในการศึกษานี้ ผู้วิจัยไม่สามารถนำซีรัมไปทดสอบด้วยวิธีดั้งเดิมได้ เนื่องจากสารเคมีบางชนิดที่ใช้ในการทดสอบนั้นไม่สามารถนำเข้าจากต่างประเทศได้ จึงไม่สามารถแสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างสองวิธี อย่างไรก็ตามผลที่ได้เมื่อนำมาคำนวณทางสถิติแล้วพบว่าข้อมูลที่วิเคราะห์ได้มีการกระจายตัวแบบปกติ และนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน หาช่วงค่า mean ± 3SD แล้วตัดค่าที่เกินช่วงดังกล่าวออก นำข้อมูลที่เหลือมาคำนวณ mean และ SD ซ้ำอีกครั้ง ค่าอ้างอิงที่ได้อยู่ระหว่าง mean ± 2SD ซึ่งทำให้มั่นใจได้ว่าค่าอ้างอิงที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

## สรุป

จากการศึกษาในครั้งนี้ ค่าเฉลี่ยอายุของอาสาสมัครคือ 40 ปี และผลการทดสอบ CH50, C3 และ C4 ค่าเฉลี่ยคือ 55.86 ยูนิต/มิลลิลิตร 134.67 มิลลิกรัม/เดซิลิตร 27.20 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ CH50 คือ 9.02 ดังนั้นค่าอ้างอิงในซีรัมของผู้บริจาคโลหิตมีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ดี คือ 37.83 - 73.89 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยในทางคลินิกจะพิจารณาระดับค่า CH50 ในซีรัม ที่ต่ำกว่า 37.83 ยูนิต/มิลลิลิตร ถือว่ามีความสำคัญทางคลินิก และช่วยให้แพทย์วินิจฉัยโรคทางภูมิคุ้มกันและหรือโรคติดเชื้อได้อย่างถูกต้องต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงดุจใจ ชัยวานิชศิริ ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ได้เห็นชอบและอนุมัติให้ทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้บริจาคโลหิตทุกท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ บริษัท อิควาน จำกัด ที่มอบทุนสนับสนุนค่าน้ำยาที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ด้วย

**เอกสารอ้างอิง**

1. ไหม รัตนวรารักษ์. ระบบคอมพลีเมนท์. ใน: ไหม รัตนวรารักษ์, บรรณาธิการ. วิทยาภูมิคุ้มกันพื้นฐานและคลินิก. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2543. หน้า 77-92.
2. ปฐมาภรณ์ เล็กประเสริฐ, ไหม รัตนวรารักษ์. ระบบคอมพลีเมนท์. ใน: อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, บรรณาธิการ. วิทยาภูมิคุ้มกันพื้นฐานและคลินิก. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2551. หน้า 103-17.
3. Kuby J, Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. The complement system. In: Kindt TJ, editors. Kuby Immunology 6th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2007.p.168-88.
4. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. Complement. In: Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I, editors. Immunology. 8th ed. New York: Elsevier; 2012. p.71-88.
5. Siest G. Study of reference values and biological variation: a necessity and a model for Preventive Medicine Centers. Clin Chem Lab Med 2004;42: 810-6.
6. Allansmith M, Mcclellan B, Butterworth M. The influence of heredity and environment on human immunoglobulin levels. J Immunol 1969;102: 1504-10.
7. Yamamoto S, Kubotsu K, Kida M, Kondo K, Matsuura S, Uchiyama S, et al. Automated homogeneous liposome-based assay system for total complement activity. Clin Chem 1995;41:586-90.
8. Murphy K, Weaver C, Janeway CA. Janeway's immunobiology. 9th ed. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC; 2017.
9. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
10. Jollift CR, Cost KM, Stivrins PC, Grossman PP, Nolte CR, Franco SM, et al. ReferenceIntervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry. Clin Chem 1982;28:126-8.
11. Unsworth DJ. Complement deficciency and disease. J Clin Pathol 2008;61:1013-7.
12. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N. Essentials of clinical immunology. 6th ed. Oxford: John Wiley & Sons; 2014.
13. Milford-Ward A. Riches PG. Fifield R. Smith AM. Protein reference unit handbook of clinical immunochemistry. 6th ed. Sheffield, UK: PRU Pubns; 1999.
14. Okumura N, Nomura M, Tada T, Kameko M, Moriyama T, Katsuyama T, et al. Effects of sample storage on serum C3 assay by immunonephelometry. Clin Lab Sci 1990;3:54-7.
15. Kardar GA, Oraei M, Shahsavani M, Namdar Z, Kazemisefat GE, Haghi MT, et al. Reference intervals for serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM and complements C3 and C4 in Iranian healthy children. Iran J Publ Health 2012;41:59-63.
16. Mosca T, Menezes MC, Dionigi PC, Stirbulov R, Forte WC. C3 and C4 complement system components as biomarkers in the intermittent atopic asthma diagnosis. J Pediatr (Rio J) 2011;87:512-6.