

การพัฒนาชุดน้ำยาและระบบตรวจวัดเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน
ในปัสสาวะในระดับภาคสนาม

นางสาววรรษยา สีนวัต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

IN-HOUSE DEVELOPMENT OF ASSAY REAGENTS AND THE PORTABLE OPTICAL
DETECTION SYSTEM FOR IN-FIELD ANALYSIS OF MICROALBUMINURIA

Miss Warattaya Sinwat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาชุดน้ำยาและระบบตรวจวัดเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในระดับภาคสนาม

โดย

นางสาววรรษยา สินวัต

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

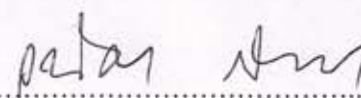
ดร. อติสร เตือนตรานนท์


คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

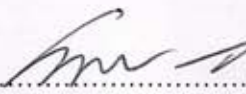

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา นพพรพันธ์)

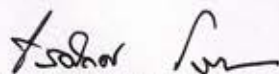
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. อติสร เตือนตรานนท์)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ เกษัชกร ดร. อีรศักดิ์ โรจนราชา)

วิจัยา ลินวัต : การพัฒนาชุดน้ำยาและระบบตรวจวัดเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในระดับภาคสนาม. (IN-HOUSE DEVELOPMENT OF ASSAY REAGENTS AND THE PORTABLE OPTICAL DETECTION SYSTEM FOR IN-FIELD ANALYSIS OF MICROALBUMINURIA) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล,อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.อดิสร เตือนตรานนท์, 132 หน้า.

วิธีการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการ particle enhanced turbidimetric-inhibition immunoassay (PETINIA) ได้ถูกดัดแปลงใหม่ อัลบูมินจากซีรัมคนถูกตรึงบนคาร์บอกซิลโพลีสไตรีนบีดส์ผ่านการตรึงบนบรานซ์โพลีเอทิลีนอิมิน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ประจุบวกทำการตรึงอยู่บนผิวบีดส์ที่มีประจุลบ น้ำยาสำหรับตรวจวัดประกอบด้วย 20 mM โฟสเฟตเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี 200 mM NaCl และ 4%PEG เป็นองค์ประกอบติดตามปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ 510 nm เป็นเวลา 2 นาที วิธีการตรึงนี้ทำให้บีดส์มีความคงตัวสูงอย่างน้อย 6 เดือน การตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยหลักการ PETINIA ไม่ถูกกระทบจาก hook effect เมื่อตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้นมากกว่า 1000 mg/L ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการตรวจวัดภายในวันเดียวคือ 7.2 และ 2.2% ระหว่างวันเป็นเวลา 20 วัน คือ 9.5 และ 3.1% เมื่อทดสอบโดยตรวจวัดอัลบูมินจากสิ่งตัวอย่างควบคุมที่ความเข้มข้นต่ำและสูงตามลำดับ วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดระหว่าง 0 – 150 mg/L ($r^2=0.996$) ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 7.14 mg/L ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยาอยู่ในช่วงที่น่าพอใจมีค่าการคืนกลับระหว่าง 95-105.8 % น้ำยาและระบบที่พัฒนาขึ้นเมื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดในระดับภาคสนาม พบว่าผลการตรวจวัดค่าไมโครอัลบูมินในปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 120 รายมีความสัมพันธ์ที่ดีและสอดคล้องกับผลการตรวจวัดด้วยวิธีอิมมูโนเทอร์ปีไดเมทรีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ($r^2=0.970$)

ภาควิชา.....เคมีคลินิก.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา 2554.....

ลายมือชื่อนิสิต วริศรา งามใจ
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก วนิดา หลายวัฒนไพศาล
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อดิสร เตือนตรานนท์

5277212037 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEYWORDS :MICROALBUMIN / PARTICLE ENHANCED TURBIDIMETRIC-
INHIBITION IMMUNOASSAY / HOOK EFFECT / IN-FIELD ANALYSIS

WARATTAYA SINWAT : IN-HOUSE DEVELOPMENT OF ASSAY REAGENTS
AND THE PORTABLE OPTICAL DETECTION SYSTEM FOR IN-FIELD
ANALYSIS OF MICROALBUMINURIA. ADVISOR : ASST.PROF. WANIDA
LAIWATTANAPAISAL, Ph.D., CO-ADVISOR : ADISORN TURNTRANONT,
Ph.D., 132 pp.

A modified method based on particle enhanced turbidimetric-inhibition immunoassay (PETINIA) has been proposed for the determination of microalbuminuria (MAU). Human serum albumins were immobilized onto the surface of highly carboxylated polystyrene beads via strong cationic branched polyethyleneimine (BPEI) polymer functionalized to the bead's surface. The assay reagent composed of 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 in the present of 200 mM NaCl and 4%PEG. An absorbance increased was monitored at 510 nm for 2 min. The storage stability of the immobilized beads was at least 6 months. This method was proven to be accurate and did not affect by hook effect phenomenon when tested with albumin concentration higher than 1,000 mg/L. The intra-assay coefficient of variations (CVs) were 7.2 and 2.2%, and inter-assay CVs were 9.5 and 3.1% (n=20), as assessed by low and high microalbumin liquid controls, respectively. This method was linear from 0 to 150 mg L⁻¹ (r² = 0.996), with a detection limit of 7.14 mg L⁻¹. Interfering compound tests were satisfactory with recoveries of 95.0% to 105.8%. The system demonstrated its applicability to perform accurate measurements outside the laboratory for in-field analysis of the MAU assay. The albumin concentrations in real urine samples measured by this proposed method correlated well with the immunoturbidity performed on an automated analyzer with r² = 0.97 (n = 120)

Department : Clinical Chemistry.....	Student's Signature <i>Warattaya Sinwat</i>
Field of Study : Clinical Biochemistry and Clinical Chemistry.....	Advisor's Signature <i>Wanida Laiwattana Paisal</i>
Academic Year :2011.....	Co-advisor's Signature <i>Adisorn Turntranont</i>

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ดร. อติสร เตือนตรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้คำปรึกษา แนะนำและแก้ไขปัญหาด้านต่างๆ ตลอดจนถึงติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาว์ กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ เกษัชกร ดร. ธีรศักดิ์ โรจนราชา กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมีบางส่วนในงานวิจัย และขอขอบคุณนักวิจัย จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) หน่วยงาน NECTEC ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสร้างอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก โรงพยาบาลราชวิถี ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยโรคเบาหวานเพื่อนำมาทดลองในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลเขาขลุ่ยและตำบลท่าผา อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสมเด็จพระสังฆราชองค์ที่ 17 จังหวัดสุพรรณบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และดูแลความเรียบร้อยระหว่างการทดลองในระดับภาคสนาม

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ทุนโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้าน Omics-Nano Medical Technology

ขอขอบคุณ เพื่อน น้อง สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ และสาขาเทคนิคการแพทย์ทุกคน ตลอดจนบุคคลต่างๆที่ไม่สามารถกล่าวได้หมดในที่นี้ ที่คอยให้กำลังใจเมื่อเกิดปัญหาและให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ทุกสิ่งทุกอย่างแก่ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.5 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 โรคเบาหวาน (Diabetes Mellitus).....	7
2.2 โรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy).....	8
2.3 อัลบูมินในซีรัมคน (Human Serum Albumin; HSA).....	14
2.4 กลไกการเกิดไมโครอัลบูมินูเรีย.....	14
2.5 ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (Microalbuminuria).....	15
2.6 วิธีรายงานผลการตรวจวัดเชิงปริมาณจาก microalbumin ในปัสสาวะ... ..	16
2.7 ความสำคัญของการตรวจหา microalbumin ในปัสสาวะ.....	16
2.8 ข้อจำกัดของการตรวจ microalbumin ในปัสสาวะ.....	19
2.9 วิธีการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ.....	21

2.10	วิธีการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณแบบต่างๆในงานวิจัยที่ผ่านมา.....	24
2.11	การตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะด้วยหลักการ latex immunoassay...	27
2.12	งานวิจัยต่างๆที่ใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA).....	29
2.13	หลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA).....	30
2.14	สภาวะรบกวนการเกิดปฏิกิริยา immunoassay จาก hook effect (antigen excess).....	32
2.15	ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาแอนติเจน - แอนติบอดี.....	33
2.16	การตรึงโปรตีนบน beads (Adsorption to beads).....	35
2.17	Polyethylenimine (PEI).....	39
2.18	การตรวจวัดเชิงแสง (Optical detection).....	41
2.19	หลักการของ fiber optic sensor.....	42
2.20	การวัดการดูดกลืนแสง (Absorption detection).....	45
2.21	การนำ fiber optic sensor ไปใช้ประโยชน์.....	46
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	48
3.1	ประชากรที่ใช้ในงานวิจัย.....	48
3.2	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	48
3.3	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	50
3.4	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	51
3.5	วิธีดำเนินการวิจัย.....	53
3.5.1	การตรึง Human Serum Albumin (HSA) บน carboxylated polystyrene beads.....	53
3.5.2	วิธีการตรวจหาโปรตีนก่อนและหลังตรึงโดยวิธี Bradford protein assay.....	54

3.5.3 การทดสอบลักษณะทางกายภาพของ beads ก่อนตรึงและหลังตรึง human serum albumin โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.....	55
3.5.4 วิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการ PETINIA.....	57
3.5.5 การติดตั้งระบบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเพื่อใช้ในภาคสนาม.....	58
3.5.6 การติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller).....	60
3.5.7 การหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ของน้ำยาและวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ.....	61
3.5.8 การศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterization).....	65
3.5.9 การทดลองตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในผู้ป่วยเบาหวานเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน.....	67
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	69
4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึง Human Serum Albumin บน carboxylated polystyrene beads.....	69
4.2 ผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพของ beads ก่อนตรึงและหลังตรึง human serum albumin โดยใช้ TEM.....	72
4.3 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ของน้ำยาและวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ.....	73
4.3.1 ผลการทดสอบหาปริมาณ human serum albumin ที่เหมาะสมในการตรึง beads	73
4.3.2 การทดสอบหาปริมาณ PEI ที่เหมาะสมในการตรึง beads.....	75
4.3.3 การทดสอบหาช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม.....	76
4.3.4 การทดสอบหาระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม.....	77
4.3.5 ผลการทดสอบชนิดและความแรงของเกลือ (Ionic strength) ใน assay buffer	79

4.3.6 ผลการทดสอบหาปริมาณ polyethylene glycol (PEG) ที่เหมาะสมใน assay buffer	81
4.3.7 ผลการทดสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา.....	83
4.3.8 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา.....	84
4.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้(Characterization).....	86
4.4.1 ผลการทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range).....	86
4.4.2 ผลการทดสอบหาค่า Limit of Detection (LOD).....	87
4.4.3 ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (Interference).....	88
4.4.4 ผลการทดสอบหาค่าความเที่ยงตรงของการตรวจวัด (Precision and reproducibility).....	89
4.4.5 ผลการทดสอบหาความคงตัวของ immobilized beads.....	90
4.4.6 ผลการทดสอบความแปรปรวน ของการเตรียม immobilized beads.....	91
4.5 ผลการทดลองตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในผู้ป่วยเบาหวานเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ.....	93
4.5.1 การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ.....	93
4.5.2 การทดลองในระดับภาคสนาม.....	98
4.6 ผลทดสอบการเกิด hook effect จากการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการ PETINIA และ Immunoturbidimetric assays.....	100
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	102
รายการอ้างอิง.....	110
ภาคผนวก.....	125
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	132

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	49
3.2	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	50
3.3	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	51
3.4	แสดงขั้นตอนการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ	58
4.1	แสดงประสิทธิภาพการตรึง human serum albumin บน beads จำนวน 6 ครั้ง	70
4.2	แสดงผลการวิเคราะห์หาค่า limit of detection ของการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน	88
4.3	แสดงผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยาตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมิน.....	89
4.4	แสดงผลการทดสอบทดสอบหาค่าความเที่ยงตรงของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้น.....	90
4.5	ผลการทดสอบความแปรปรวน ของ immobilized beads จำนวน 6 ครั้ง.....	92
4.6	ผลการทดสอบการเกิด hook effect จากการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะระหว่างวิธี Immunoturbidimetric assays และวิธี PETINIA.....	101

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การดำเนินโรคในระยะต่างๆและปัจจัยส่งเสริมการเกิดโรคไตจากเบาหวาน.....	12
2.2	ระยะเวลาการดำเนินโรคไตจากเบาหวานชนิดที่ 2.....	13
2.3	แนวทางการคัดกรองและวินิจฉัยโรคไตจากเบาหวานในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2.....	18
2.4	แสดงโรงพยาบาลศูนย์ในประเทศไทยที่สามารถตรวจหา microalbumin ในปัสสาวะได้.....	20
2.5	ปฏิกิริยาของหลักการ PETINIA กรณีที่ไม่มีอัลบูมินในปัสสาวะ.....	31
2.6	ปฏิกิริยาของหลักการ PETINIA กรณีที่มีอัลบูมินในปัสสาวะ.....	31
2.7	แสดงปรากฏการณ์ hook effect จากการมีสิ่งตัวอย่างมากเกินไป (excess antigen).....	32
2.8	แสดงขั้นตอนการตรึงแอนติบอดีบน beads แบบ passive adsorption.....	36
2.9	แสดงการตรึงโปรตีนบน Functionalized beads ชนิด carboxyl และ amino groups.....	38
2.10	แสดงโครงสร้างของ Branched-PEI และ Linear-PEI	40
2.11	แสดงโครงสร้างของสาย fiber optic และ การนำ fiber optic ไปใช้งาน.....	43
2.12	แสดงการดูดกลืนแสงของสารละลายระยะทาง 1 cm.....	46
3.1	ลักษณะภายนอกของกล่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.....	56
3.2	แสดงองค์ประกอบภายในของระบบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเพื่อใช้ในภาคสนาม.....	59
3.3	แสดงลักษณะภายนอกและช่องสำหรับใส่ตัวอย่างของเครื่องตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเพื่อใช้ในภาคสนาม	59
3.4	ภาพมุมมองด้านบน และด้านข้าง ของเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ติดตั้งใน fiber optic spectrometer.....	60

ภาพที่		หน้า
3.5	แสดงบริเวณ cuvette holder ที่มีการติดตั้งเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเชื่อมต่อด้วยสายใยแก้วนำแสง	61
4.1	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วย วิธี Bradford.....	71
4.2	แสดงภาพถ่ายแบบ Bright-field image ของ beads ก่อนตรึงและหลังตรึง human serum albumin โดย TEM.....	73
4.3	ผลของการตรึง human serum albumin ความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA	74
4.4	แสดงการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BPEI ในขั้นตอนการตรึง beads.....	75
4.5	แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา PETINIA สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ตั้งแต่ความยาวคลื่น 450-600 nm	76
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสงของ human serum albumin standard ที่ความเข้มข้นต่างๆกับความยาวคลื่นที่เปลี่ยนไป.....	77
4.7	ผลของระยะเวลาการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับอัลบูมินก่อนเริ่มปฏิกิริยา ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา PETINIA	78
4.8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป..	79
4.9	ผลของการเติม NaCl ใน assay buffer ต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA.....	81
4.10	ผลของการเติม PEG ใน assay buffer ต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA.....	82
4.11	ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA	83
4.12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอัลบูมินโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เติมในปฏิกิริยา PETINIA ต่อความไวและช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด....	85
4.13	กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้น.....	87
4.14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุการใช้งานของ immobilized beads และอัตราการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA	91

4.15	ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในระบบ batch ด้วยเครื่องspectrophotometer.....	94
4.16	กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนาม (portable-spectrometer)	96
4.17	ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนาม (ในห้องปฏิบัติการ).....	97
4.18	ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนาม (ในระดับภาคสนาม)	99
4.19	ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนามเทียบกับวิธี immunoturbidimetry	100

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวานเป็นหนึ่งในโรคพหุปัจจัย (multifactorial disease) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมและการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม เช่น ความไม่สมดุลของโภชนาการ, ขาดการออกกำลังกายและภาวะความเครียด เป็นต้น ผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงส่วนใหญ่มักไม่ทราบมาก่อนว่าตนเองเป็นโรคเบาหวานเนื่องจากไม่มีอาการแสดงของโรคที่ชัดเจนทำให้ขาดการรักษาตั้งแต่เริ่มต้น จากการสำรวจพบว่าประมาณร้อยละ 90 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมดเป็นชนิดที่ 2 โดยพบในวัยกลางคนขึ้นไป ส่วนผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 พบเป็นจำนวนน้อยกว่าและมักพบในเด็กหรือวัยรุ่น (1) โรคเบาหวานเรื้อรังเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักให้เกิดโรคอื่นๆ ตามมา เช่น ภาวะแทรกซ้อนทางสายตา (diabetic retinopathy), โรคหลอดเลือดและระบบประสาท (diabetic neuropathy), หัวใจล้มเหลว (cardiovascular disease, CVD) และโรคไตที่เกิดจากเบาหวาน (diabetic nephropathy) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่นำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage renal disease, ESRD) ถ้าไม่ได้รับการวินิจฉัยและการรักษาอย่างทันที่ อาจทำให้ผู้ป่วยต้องทุกข์ทรมานจากการล้างไต ฟอกเลือด หรือเป็นอัมพฤกษ์ อัมพาต และเป็นสาเหตุต่อมาที่ทำให้คนไข้เสียชีวิตได้ (2-5)

มีการคาดการณ์ว่าโรคเบาหวานจะเป็นปัญหาหลักด้านสาธารณสุขทั่วโลกใน ศตวรรษที่ 21 (6) เนื่องจากในปัจจุบันผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะแถบเอเชีย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (5, 7, 8) องค์การอนามัยโลกรายงานว่าในปี ค.ศ. 2010 มีผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลกจำนวน 239 ล้านคน และจะเพิ่มขึ้นเป็น 299 ล้านคนในปี ค.ศ. 2025 (9) ข้อมูลทางระบาดวิทยาในต่างประเทศพบว่าร้อยละ 30 ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ ร้อยละ 30-50 ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 จะมีภาวะแทรกซ้อนของโรคไต (10) และร้อยละ 20 -40 ของผู้ป่วยจะดำเนินไปสู่โรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease) และนำไปสู่ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ถ้าไม่ได้รับการรักษาตั้งแต่เริ่มอาการ ปัจจุบันในประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นระยะที่ไตสูญเสียหน้าที่อย่างถาวร ไม่สามารถกรองของเสียที่อยู่ในเลือดได้

ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายเป็นผู้ป่วยที่ต้องรับการบำบัดรักษาทดแทนไตด้วยการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม หรือด้วยการล้างไตด้วยน้ำยาทางช่องท้อง หรือด้วยการปลูกถ่ายไต ซึ่งต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงมาก

ปี ค.ศ. 2005 ในประเทศสหรัฐอเมริกาผู้ป่วยเบาหวานที่ต้องทุกข์ทรมานจากการล้างไตและรอเปลี่ยนไตถึง 178,689 คน (11) ปี ค.ศ. 2001 ผู้ป่วยเบาหวานในประเทศไทยต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาทั้งสิ้นเฉลี่ยปีละ 6331 ล้านบาท เป็นค่ายาประมาณ 45% และค่ารักษาผู้ป่วยใน 16 % (8) ซึ่งถ้าทำนายการเกิดโรคได้แต่เนิ่นจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการดำเนินโรคเรื้อรัง ลดค่าใช้จ่ายในการซื้อยา และไม่ต้องนอนรักษาตัวต่อเนื่องในโรงพยาบาล ถือเป็นความช่วยเหลือแก่ภาระทางเศรษฐกิจของชาติในการสนับสนุนการให้บริการผู้ป่วยโดยไม่คิดมูลค่า ดังนั้นจึงมีความพยายามในการศึกษาวิธีเพื่อช่วยวินิจฉัย ค้นหาโรคไตเรื้อรังในระยะเริ่มแรก และหาทางรักษาหรือป้องกันเพื่อชะลอความเสื่อมของไตให้โรคไตกำเริบช้าที่สุด

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางการแพทย์ทำให้สามารถตรวจพบภาวะโรคไตจากเบาหวานได้ตั้งแต่ระยะแรก เช่น การตรวจหาโปรตีนชนิดอัลบูมินปริมาณน้อยๆ ที่หลุดออกมาในปัสสาวะ เรียกว่าไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (microalbuminuria) การตรวจหาไมโครอัลบูมินในปัสสาวะสามารถใช้วินิจฉัยภาวะโรคไตจากเบาหวานได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกและเป็นระยะที่ยังสามารถรักษาให้หายขาดได้ในผู้ป่วยที่ยังไม่แสดงอาการ แต่ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานและ/หรือมีภาวะโรคไตเรื้อรังแล้ว ถือเป็น การตรวจความรุนแรงและการดำเนินไปสู่การเป็นโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย (10) และจากการวิจัยพบว่าการพบไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นเบาหวานและโรคความดันโลหิตสูงโดยไม่ทราบสาเหตุ (12-14) จากการวิจัยพบว่าผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะสูงขึ้นจะเพิ่มความเสี่ยงของการเสียชีวิตจากโรคไตและโรคหัวใจ 3.3 เท่าและ 2.6 เท่าตามลำดับ (13)

ตามข้อบ่งชี้ของ American Diabetes Association ให้ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ต้องตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะทุกปี ในรายที่ดำเนินโรคตั้งแต่ปีที่ 5 เป็นต้นไป และผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ต้องตรวจนับตั้งแต่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน อย่างต่อเนื่องทุกปี เพื่อสามารถติดตามการเสื่อมของไตอย่างมีประสิทธิภาพ (15) แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในผู้ป่วยเบาหวานนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

อนึ่งการตรวจหาภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะนี้เป็นการวัดระดับของอัลบูมินในปริมาณ 30-299 mg/L ซึ่งน้อยกว่าการตรวจหาอัลบูมินในปัสสาวะด้วยแถบทดสอบ (dipstick) ชนิดธรรมดาที่มีใช้กันอยู่ทั่วไป (ซึ่งต้องมีปริมาณอัลบูมินมากกว่า 300 mg/L จึงจะเห็นสีที่เปลี่ยนแปลง) เนื่องจากความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะ (specificity) ของวิธีดังกล่าวไม่เพียงพอ (16) ซึ่งการตรวจเจอในระยะนี้ แสดงถึงการดำเนินโรคไตไปมากแล้ว มีโปรตีนรั่วออกมาในปัสสาวะจำนวนมาก เป็นระยะที่ไม่สามารถรักษาให้หายได้ การตรวจโดยใช้แถบตรวจหาปริมาณไมโครอัลบูมินโดยเฉพาะ (microalbuminuria strip test) ที่ใช้หลักการ immunochromatography เป็นการวัดเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) พบว่ามีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ค่อนข้างสูง (ร้อยละ 99 และ 91 ตามลำดับ) แต่มักพบผลบวกปลอม (false negative result) ได้บ่อยในรายที่มีค่าอัลบูมินน้อยกว่า 20 mg/L ถึง 14.6-51 % (17, 18) ทำให้การตรวจโดยวิธีนี้ ต้องยืนยันผลตรวจด้วยวิธีเชิงปริมาณทางห้องปฏิบัติการซ้ำในรายที่ผลเป็นบวกทุกราย

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินเชิงปริมาณในปัสสาวะทางห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้หลักการด้าน immunoassay เช่น immunoturbidimetric assays, particle enhanced agglutination assay และ immunonephelometric assays ซึ่งเป็นวิธีที่วัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยตรง มีความไวและความจำเพาะสูง, เกิดปฏิกิริยารวดเร็ว และ การตรวจวัดทำได้ง่าย จึงเป็นที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน (19) แต่ข้อจำกัดของหลักการดังกล่าวคืออาจให้ผลลบปลอม (false negative results) ได้ในกรณีที่มีปริมาณอัลบูมินในส่งตัวอย่างมากเกินไป (antigen excess) เนื่องจากเกิด postzone phenomenon หรือ hook effects (20, 21) ซึ่งเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยจากการตรวจแบบ one-step immunometric assays เป็นเหตุให้การรายงานผลทางห้องปฏิบัติการผิดพลาดได้ ในปัจจุบันเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว เครื่องตรวจวิเคราะห์แบบอัตโนมัติของหลายบริษัท จึงได้เพิ่มขั้นตอนการตรวจเพื่อป้องกันการเกิด hook effects ด้วยในการตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้ง เช่น การเจือจางสิ่งส่งตรวจอีกครั้งเพื่อเทียบค่ากับก่อนการเจือจาง ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองน้ำยาและสารเคมีที่ใช้เพิ่มขึ้นเป็นเหตุให้ต้นทุนราคาตรวจวิเคราะห์สูงขึ้น (22, 23)

ปัจจุบันการตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณเป็นการตรวจที่ให้บริการเฉพาะโรงพยาบาลบางแห่ง เช่น โรงพยาบาลศูนย์ที่มีขนาดใหญ่ และโรงพยาบาลเอกชน เนื่องจากราคา

น้ำยา, แอนติบอดีและเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาค่อนข้างแพง วิธีอื่นที่ใช้หลักการด้าน immunoassay เช่น enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (24, 25), radial immunodiffusion (RID) (26), radioimmunoassay (RIA) (27), latex particle counting (28) และ non-immunoassay เช่น high performance liquid chromatography (HPLC) (29), zone electrophoresis (30) เป็นต้น ซึ่งข้อจำกัดของวิธีทั้งหลายที่กล่าวมา ต้องตรวจวัดภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์มีขนาดใหญ่ไม่สามารถพกพาได้สะดวกสำหรับใช้งานในภาคสนาม และใช้เวลาในการตรวจนาน เป็นเหตุให้โรงพยาบาลขนาดเล็ก สถานพยาบาลระดับชุมชนในบางพื้นที่ไม่มีการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ทำให้ประชากรในพื้นที่ไม่ได้รับบริการทางสาธารณสุขอย่างเท่าเทียมและดีพอ

งานวิจัยนี้ได้เสนอวิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) (31) ใช้วิธีการใหม่สำหรับการตรึงแอนติเจน highly carboxylated polystyrene beads เป็นอนุภาคที่มีประจุลบบนผิว ให้ตรึงกับ polyethyleneimine (PEI) ซึ่งเป็นสารที่มีประจุบวกสูงก่อนจะทำการตรึงอัลบูมินที่ทำให้อยู่ในสภาพที่มีประจุลบ ดังนั้น immobilized beads ที่ใช้ในปฏิกิริยาจึงมีความคงตัวสูง และการตรวจวัดแต่ละครั้งมีความแม่นยำมากขึ้น immobilized beads จะแย่งจับกับ antibody binding sites ที่เหลือจาก antigen – antibody complexes ในสารละลายที่มีปัสสาวะผู้ป่วยกับ polyclonal antibody ผสมกัน เกิดการเกาะกลุ่มระหว่าง immobilized beads และ polyclonal antibody ที่เหลือจากขั้นตอนแรก และวัดการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 510 nm อัตราการเพิ่มขึ้นของการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนผกผันกับกับปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ หลักการนี้มีข้อดีคือ ปฏิกิริยาเกิดเร็ว, มีความไวสูงในการตรวจวัดโปรตีนปริมาณน้อยๆ และไม่เกิดปฏิกิริยาผลบปลอมในกรณีที่มีอัลบูมินมากเกินไปจนเกิดการยับยั้งปฏิกิริยา (32, 33) น้ำยาที่เตรียมขึ้นเองมีความคงตัวและมีอายุการใช้งานนานหลายเดือน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบการวัดเชิงแสง (optical detection) ด้วย miniature fiber optic spectrometer ที่อาศัยเส้นใยแก้วนำแสง (fiber optic) เป็นตัวเชื่อมต่อกับแหล่งกำเนิดแสง (light source) และตัวตรวจวัด (detector) ที่มีขนาดเล็กสามารถพกพาไปใช้ในภาคสนามได้ เหมาะสำหรับสถานบริการสาธารณสุขที่ห่างไกล เป็นผลให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานและกลุ่มเสี่ยงอื่นๆ ได้รับบริการทางสาธารณสุขอย่างเท่าเทียมกัน นับเป็นมาตรการเชิงรุกของการป้องกันการเป็นโรคไตจากเบาหวานได้ เป็นการยกระดับการรักษาสุขภาพ และป้องกันความสูญเสียด้านเศรษฐกิจของชาติได้เป็นอย่างมาก ในงานวิจัยนี้

ได้มีการแสดงศักยภาพของน้ำยาและวิธีการตรวจวัด โดยออกภาคสนาม ทดสอบกับปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวาน ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลจำนวน 5 แห่ง และให้ผลการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่มีความสอดคล้องกับวิธีที่ใช้ทั่วไปทางห้องปฏิบัติการการแพทย์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาน้ำยาตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ที่ใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) ที่มีคุณภาพและความคงตัวใกล้เคียงกับน้ำยาที่นำเข้ามาจากต่างประเทศและลดโอกาสการเกิดผลลบปลอมในกรณีที่มีอัลบูมินในปัสสาวะมากเกินไป
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา สำหรับการตรวจวัดเชิงแสง (optical detection) ด้วยเครื่องมือและโปรแกรมที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในระดับภาคสนาม สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะจากผู้ป่วยเบาหวาน

ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยระบบการตรวจวัดปฏิกิริยาเชิงแสง (optical detection) โดยใช้ miniature spectrometer เป็น detector มีขนาดเล็กจัดวางอย่างเป็นระบบในกล่องหรือกระเป๋าสามารถพกพาไปใช้ในภาคสนามได้ ในส่วนของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ได้ศึกษาวิจัยการตรึง human serum albumin บน carboxylated polystyrene beads และทดสอบความคงตัวของน้ำยา การตรวจวัดใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) และเก็บสิ่งส่งตรวจจากปัสสาวะแบบสุ่มจากผู้ป่วยโรคเบาหวานในโรงพยาบาลชุมชน 5 แห่ง จำนวนแห่งละ 20 คน และเปรียบเทียบผลกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำระบบการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเบาหวานได้จริง โดยเน้นผู้ป่วยที่อยู่ห่างไกลจากบริการสาธารณสุข
2. สามารถพัฒนาน้ำยาและเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดโอกาสการเกิดผลลบปลอมในกรณีที่มีปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะมากเกินไป
3. เป็นนวัตกรรมทางการแพทย์ที่ผลิตขึ้นใช้เองภายในประเทศ มีประโยชน์ในการวินิจฉัยค้นหา และป้องกันความเสี่ยงในการเกิดโรคไตจากเบาหวาน
4. สามารถพัฒนาระบบการตรวจวัดเพื่อนำไปใช้ตรวจวัดสารชีวเคมีอื่นๆในร่างกายได้
5. วิธีที่พัฒนาขึ้นเพิ่มความพึงพอใจต่อบุคลากรทางการแพทย์และสร้างโอกาสให้หน่วยงานสาธารณสุขที่ให้บริการผู้ป่วยโรคเบาหวานและประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อโรคที่เกี่ยวข้องกับการตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ
6. คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ในวารสารระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้องอย่างน้อย 1 เรื่อง และสามารถนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำผลงานวิจัยเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเบาหวาน (Diabetes Mellitus)

โรคเบาหวานเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบเผาผลาญอาหาร (metabolic diseases) ในร่างกาย โดยปกติน้ำตาลจะเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงานภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนอินซูลิน แต่ในผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน เซลล์ในร่างกายจะไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้งานได้ อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงกว่าปกติ (hyperglycemia) คือ มากกว่าหรือเท่ากับ 126 mg/dL หลังรับประทานอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง สาเหตุเกิดจากความผิดปกติของเบต้าเซลล์ในตับอ่อนทำให้หลังฮอร์โมนอินซูลินลดลง หรือมีฮอร์โมนอินซูลินแต่เซลล์ตอบสนองต่อฤทธิ์ของอินซูลินน้อยกว่าที่ควร ทำให้ร่างกายมีภาวะทนต่อน้ำตาลลดลง (Glucose intolerance) เรียกว่ามี “ภาวะดื้อต่ออินซูลิน” (insulin resistance) หรือมีความผิดปกติทั้งสองอย่างร่วมกัน ผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงเป็นระยะเวลานาน จะก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายจนอวัยวะนั้นไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและเสียสภาพไปในที่สุด ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้จะนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ได้แก่ ภาวะแทรกซ้อนทางตา (diabetic retinopathy), ไต (diabetic nephropathy), ระบบประสาท (diabetic neuropathy), หัวใจและหลอดเลือด ผู้ป่วยเบาหวานส่วนใหญ่มักพบความผิดปกติของการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมันและโปรตีนร่วมด้วย พบได้บ่อยในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (34) ส่วนโรคเบาหวานชนิดที่ 1 สาเหตุของโรคเกิดจาก autoimmunity มักพบในเด็กหรือวัยรุ่นและส่วนใหญ่ไม่อ้วน โรคเบาหวานชนิดนี้ถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (35)

เนื่องจากกลไกการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 มีความสัมพันธ์กันกับพันธุกรรมและระบบ autoimmunity ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาผู้ป่วยที่มีแนวโน้มของโรคตั้งแต่ระยะเริ่มต้นเพื่อป้องกันหรือชะลอความรุนแรงในการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 โดยตรวจหา autoantibodies หรือ gene ที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานชนิดที่ 1 เพื่อเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยทางคลินิกได้ (36-38) ผู้ป่วยประเภทนี้จะมาพบแพทย์ครั้งแรกด้วยอาการของ ketoacidosis หรือ

อาจมีระดับน้ำตาลในเลือดก่อนอาหารเช้าสูงปานกลางหรือสูงมากขึ้นอยู่กับอัตราการถูกทำลายของเซลล์เบต้าในตับอ่อนที่แตกต่างกัน (39) ส่วนโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบได้บ่อยประมาณ 90% ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด แต่ยังไม่ทราบสาเหตุการเกิดโรคที่ชัดเจน โรคเบาหวานชนิดนี้มักไม่ได้รับการวินิจฉัยตั้งแต่ระยะแรกเนื่องจากระดับน้ำตาลในเลือดจะสูงขึ้นช้าๆ และมักไม่เกิดภาวะ ketoacidosis จึงไม่แสดงอาการที่ผิดปกติให้เห็น ทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่ทราบว่าตนเองเป็นเบาหวานมาก่อนจนกระทั่งตรวจพบโรค (40)

โรคเบาหวานถือเป็นโรคเรื้อรังชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจในประเทศที่กำลังพัฒนาทั้งหลายรวมถึงประเทศไทย จากการสำรวจในปี 2543 พบว่าจำนวนผู้ป่วยเบาหวานที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไปในประเทศไทยมีประมาณ 9.6 % จากจำนวนประชากรในประเทศทั้งหมดหรือประมาณ 2.4 ล้านคน (41) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในจำนวนนี้พบว่าส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเพศหญิงและอาศัยอยู่ในเขตเมือง ความชุกของโรคเบาหวานในประเทศไทยมากขึ้นตามอายุของประชากรที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 45 ปีขึ้นไปจนถึงผู้สูงอายุ (42)

จากการสำรวจโรคเบาหวานในไทยพบว่าร้อยละ 41 ของผู้ป่วยไม่ทราบว่าตนเองเป็นโรคเบาหวานมาก่อนและควบคุมโรคได้เพียงร้อยละ 26 เท่านั้น มีการคาดการณ์ว่าหากมีผู้ป่วยรวม 3 ล้านคนในปี 2550 จะต้องเสียค่าใช้จ่ายของชาติถึง 3.5-8.4 หมื่นล้านบาท (43) จากหลักฐานทางระบาดวิทยาพบว่าภาวะแทรกซ้อนสูงสุดของโรคเบาหวานในไทย ได้แก่ ไตเสื่อมถึงร้อยละ 43.9 ต้อกระจกร้อยละ 42.8 และจอประสาทตาเสื่อมร้อยละ 30.7 ในขณะที่มีภาวะแทรกซ้อนต่อโรคหัวใจขาดเลือดและโรคหลอดเลือดในสมองร้อยละ 8.1 และ 4.4 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ยังไม่แสดงอาการของโรคเบาหวานนั้นเท่ากับผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้แล้วและสูงกว่าผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน 2 เท่า ดังนั้นการค้นหาประชากรกลุ่มเสี่ยงเพื่อป้องกันการเกิดโรคและเฝ้าระวังการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานจึงมีความสำคัญเพื่อลดปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคแทรกซ้อนนำไปสู่การเสียชีวิตในลำดับต่อมา (43)

2.2 โรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy)

โรคไตจากเบาหวานเป็นภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังลำดับต้นๆ ในผู้ป่วยเบาหวานพบได้ประมาณร้อยละ 30-50 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease:CKD) และนำไปสู่ภาวะไตวายระยะสุดท้าย (end stage renal disease:ESRD) ภายในระยะเวลา 7-10 ปีถ้าไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทำให้ต้องได้รับการรักษาทดแทนไต ข้อมูลจากรายงานการลงทะเบียนการรักษาทดแทนไตปี พ.ศ. 2540-2543 รวบรวมโดยอนุตตร จิตตินันท์ พบว่าผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ลงทะเบียนการรักษาทดแทน

ไตเนื่องจากเบาหวานมีถึงประมาณ 30% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 เนื่องจากความชุกของโรคมีมากกว่าเบาหวานชนิดที่ 1

2.2.1 ลักษณะทางคลินิกของโรคไตจากเบาหวานประกอบการตรวจพบต่อไปนี (44)

1. มีภาวะโปรตีนชนิดอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะ (albuminuria) ซึ่งในระยะแรกมีปริมาณเล็กน้อย (microalbuminuria) คือมี urine albumin excretion rate (UAE) 30-299 มิลลิกรัม/วัน และต่อมาปริมาณมากขึ้น (macroalbuminuria หรือ overt proteinuria) คือมี UAE มากกว่า 300 มิลลิกรัม/วัน โดยไม่ได้เกิดจากสาเหตุอื่น
2. มีความดันโลหิตสูง (วินิจฉัยโดยมีความดันโลหิตสูงกว่า 140/90 มิลลิเมตรปรอทเมื่อยังไม่ได้รับการรักษา หรือความดันโลหิตสูงกว่า 130/80 มิลลิเมตรปรอทเมื่อได้รับการรักษาแล้ว)
3. การทำงานของไต (glomerular filtration rate; GFR) ในระยะแรกจะปกติหรือสูงกว่าปกติ ต่อมาจะเริ่มเสื่อม และเสื่อมมากขึ้นจนเกิดโรคไตเรื้อรังในระยะท้ายที่สุดในที่สุด

2.2.2 การดำเนินโรคของไตจากเบาหวาน (45)

C.E.Mogensen และคณะ ได้แบ่งการดำเนินโรคของ Diabetic nephropathy ในเบาหวานชนิดที่ 1 ซึ่งมีการศึกษามานานและมีข้อมูลค่อนข้างมาก และธรรมชาติของโรคไม่แตกต่างจากเบาหวานชนิดที่ 2 มากนัก เป็นระยะดังนี้

ระยะที่ 1 Renal hyperfunction (renal hypertrophy)

ระยะนี้ผู้ป่วยมีอาการของเบาหวานในระยะแรกเริ่มวินิจฉัย คือ ปัสสาวะบ่อย ดื่มน้ำบ่อย น้ำหนักตัวลด และอาจมีภาวะ ketoacidosis ในระยะนี้ผู้ป่วยส่วนหนึ่งจะพบอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะ (urine albumin excretion;UAE) การเปลี่ยนแปลงจะพบ glomerular hyperfiltration (GHF) โดย glomerular filtration rate (GFR) จะเพิ่มจากเดิมประมาณร้อยละ 20-40 ร่วมกับมี renal plasma flow สูงขึ้นร้อยละ 9-14 และขนาดของไตโตขึ้นกว่าปกติร้อยละ 20 (glomerular hypertrophy) แต่ในกรณีเบาหวานชนิดที่ 2 นั้น GHF และ glomerular hypertrophy จะพบน้อยกว่าเบาหวานชนิดที่ 1 อาจเป็นเพราะเกิดในผู้ป่วยที่สูงอายุกว่า ทำให้ไม่เกิด glomerular hypertrophy หรือเกิดน้อยกว่า เบาหวานชนิดที่ 1 นอกจากนั้นอาจพบการหนาตัวของ glomerular basement membrane และการขยายขนาดของ mesangium

ระยะที่ 2 Clinical latency (early renal lesion without clinical sign)

เกิดหลังการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานประมาณ 2-3 ปี ตรวจการทำงานของไตและ UAE ยังปกติ จึงเรียกระยะนี้รวมกับระยะที่ 1 ว่า normoalbuminuria ความผิดปกติในระยะนี้คือพยาธิสภาพที่ไตเด่นชัดมากขึ้น คือมีการหนาตัวของ glomerular basement membrane และการขยายขนาดของ mesangium นอกจากนี้ยังพบการหนาตัวของ tubular basement membrane ร่วมด้วยแต่ยังไม่มี ความผิดปกติทางคลินิกหากควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่ถ้าควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ไม่ดี ร้อยละ 30-40 ของผู้ป่วยจะดำเนินเข้าสู่ระยะที่ 3 คือ microalbuminuria

ระยะที่ 3 Microalbuminuria (incipient diabetic nephropathy)

ระยะนี้จะพบหลังจากเป็นเบาหวานแล้ว 5-10 ปี เป็นระยะแรกที่สามารถตรวจพบได้ทางห้องปฏิบัติการ จุดสำคัญของระยะนี้คือ ตรวจพบอัลบูมินในปัสสาวะ(UAE)เพิ่มขึ้นมากกว่าคนปกติ ปริมาณอัลบูมินที่ถือว่าเป็น microalbuminuria คือ 30-299 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งต้องตรวจพบ 2 ใน 3 ครั้งในระยะเวลาไม่เกิน 6 เดือน การตรวจ UAE เพียงครั้งเดียวถือว่ายังไม่มีความแม่นยำพอ เพราะจะมีเพียงร้อยละ 47 ของผู้ป่วยเท่านั้นที่มี persistent microalbuminuria จึงต้องกำหนดให้มี 2 ใน 3 ครั้งของการตรวจ ในระยะนี้อาจพบความดันโลหิตสูงร่วมด้วย จากการศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด และมีปัจจัยเสี่ยงต่อ atherosclerosis ร้อยละ 29 ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และร้อยละ 10-40 ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มี microalbuminuria จะดำเนินเข้าสู่ระยะ macroalbuminuria ภายในระยะเวลา 5-10 ปี

อนึ่งการตรวจปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะระยะนี้ไม่สามารถตรวจพบโดยใช้แถบสีตรวจปัสสาวะทั่วไป (dipstick) จึงเรียกระยะนี้ว่า microalbuminuria หรือ incipient diabetic nephropathy หรือ early diabetic nephropathy

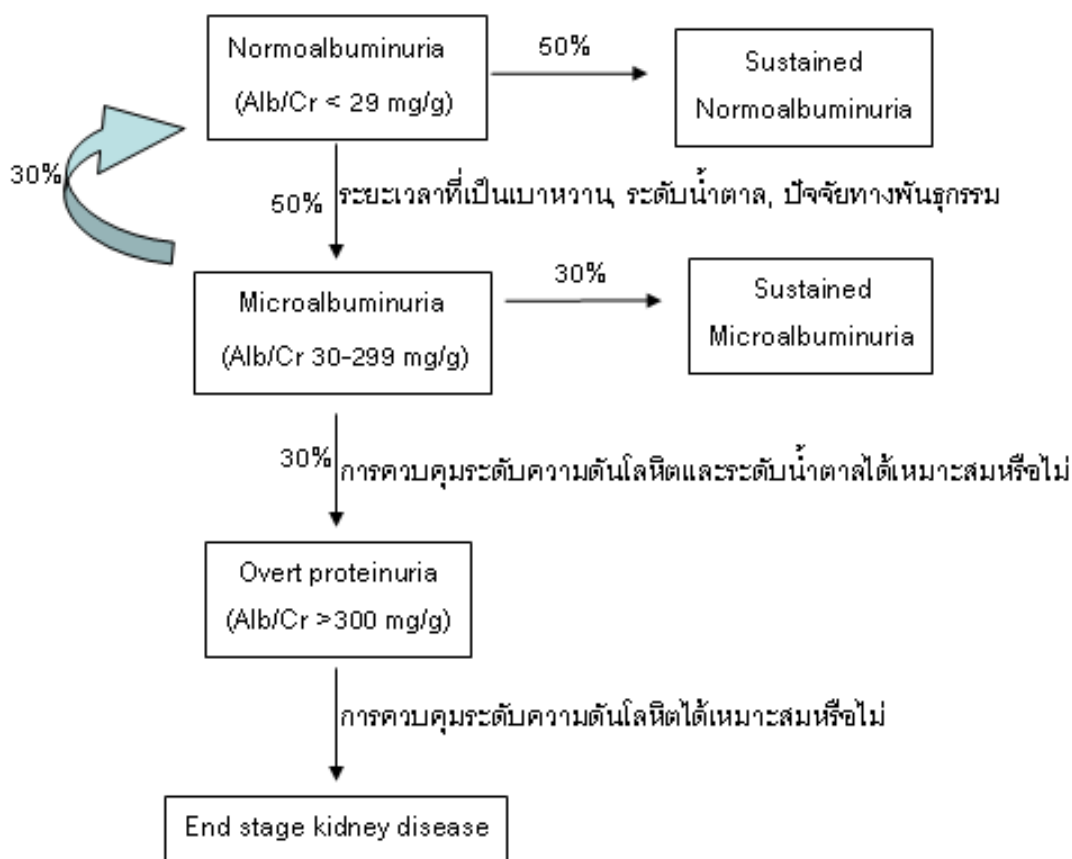
ระยะที่ 4 Macroalbuminuria (clinical overt diabetic nephropathy)

ระยะนี้จะเกิดหลังจากเป็นเบาหวานมาไม่น้อยกว่า 10 ปี จะตรวจพบ UAE มากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อวัน และบางครั้งอาจมากถึง nephritic range (3500 มิลลิกรัมต่อวัน) เป็นระยะที่ตรวจพบอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้แถบสีตรวจปัสสาวะ (dipstick) การตรวจปัสสาวะนอกจากพบอัลบูมินแล้ว อาจพบเม็ดเลือดแดงได้ใน overt diabetic nephropathy ซึ่งเกิดจากการแตกของ microaneurysm ในไต หรือการมี thin glomerular basement membrane disease ร่วมด้วย GFR ของผู้ป่วยระยะนี้จะลดลงและลดลงเร็วยิ่งขึ้นตามความดันโลหิตที่สูงขึ้น อุบัติการณ์สะสม

ของระยะ macroalbuminuria ในระยะเวลา 15-29 ปี ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 มีประมาณร้อยละ 14-17 และอุบัติการณ์สะสมในระยะเวลา 20 ปี ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีประมาณร้อยละ 27 โดยทั่วไปพบว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 จะมี macroalbuminuria เร็วกว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ประมาณ 5 ปี และหากไม่ได้รับการรักษาที่ดีจะใช้ระยะเวลาอีก 7-10 ปีเข้าสู่ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (ERSD)

ระยะที่ 5 End-stage renal disease;ESRD (ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย)

ผู้ป่วยระยะนี้จะมี GFR ต่ำมากคือน้อยกว่า 15 มิลลิลิตรต่อนาที ความดันโลหิตสูงขึ้นและควบคุมได้ยากขึ้น ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะอาจลดลงเล็กน้อยเนื่องจาก GFR ที่ลดลงแต่ยังอยู่ในช่วงของ macroalbuminuria ผู้ป่วยระยะนี้จำเป็นต้องได้รับการรักษาทดแทนไต (renal replacement therapy) และมีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดและเสียชีวิตมากกว่าผู้ป่วยเบาหวานระยะ macroalbuminuria และมากกว่าผู้ป่วย ESRD จากสาเหตุอื่น การศึกษาระยะหลังพบว่าอุบัติการณ์ของไตวายระยะสุดท้ายและเสียชีวิตในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ลดลงเนื่องจากการรักษาที่ดีขึ้น ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าร้อยละ 10-35 มีอัตราการตายที่สูงมากเนื่องจากผู้ป่วยเกิดภาวะ shock จากภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำจากการทำงานของไตที่ลดลง



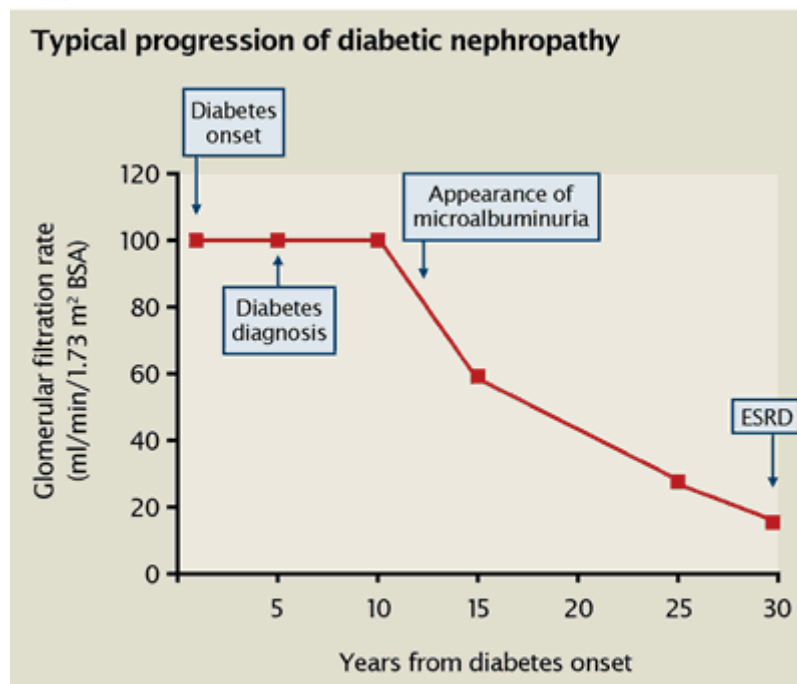
ภาพที่ 2.1 การดำเนินโรคในระยะต่างๆและปัจจัยส่งเสริมการเกิดโรคไตจากเบาหวาน

2.2.3 อุบัติการณ์ของการเกิดโรคไตจากเบาหวาน (46)

ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ร้อยละ 50 จะตรวจพบ microalbuminuria ได้หลังจากวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวานนาน 5-10 ปีหากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมผู้ป่วยกลุ่มนี้ถึงร้อยละ 80 จะมีอัตราสิ้นในปัสสาวะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เข้าสู่ระยะ overt nephropathy ร้อยละ 20 ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 จะมีโรคไตจากเบาหวานและเข้าสู่ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายภายในระยะเวลา 20 ปีหลังจากวินิจฉัย

ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 จากการสำรวจในประเทศไทยพบว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีภาวะ microalbuminuria ร้อยละ 18.7-43.5 และพบภาวะ overt nephropathy แล้วร้อยละ 1.6-5.1 (47) ส่วนใหญ่จะพบภาวะ microalbuminuria และ overt nephropathy แล้วตั้งแต่เริ่มวินิจฉัย อาจเนื่องมาจากผู้ป่วยเป็นเบาหวานมาเป็นระยะเวลานานโดยไม่มีอาการหรือไม่เคยได้รับการตรวจวินิจฉัยมาก่อน หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ประมาณร้อยละ 20 จะเข้าสู่ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ถึงแม้ว่าอัตราการลดลงของหน้าที่ไตในผู้ป่วยเบาหวานชนิด

ที่ 2 ไม่แตกต่างไปจากผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 แต่ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีอายุมากกว่าและมีอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดหัวใจและสมองมากกว่า จึงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตก่อนมีภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย



Adapted from Approach to the Patient with Type 2 Diabetes and Progressive Kidney Disease, *JCEM*. Reference 5.

ที่มา www.parkhurstexchange.com

ภาพที่ 2.2 ระยะเวลาการดำเนินโรคไตจากเบาหวานชนิดที่ 2 (48)

2.2.4 ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตจากเบาหวาน ได้แก่

1. ระยะเวลาของการเป็นเบาหวานมานาน
2. มีประวัติครอบครัวของโรคไตจากเบาหวานหรือไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายหรือความดันโลหิตสูง
3. การควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี
4. การควบคุมระดับความดันโลหิตสูงได้ไม่ดี
5. ภาวะไขมันในเลือดสูง
6. มีโปรตีนชนิดอัลบูมินรั่วออกทางปัสสาวะมากกว่าปกติ
7. การสูบบุหรี่

2.3 อัลบูมินในซีรัมคน (Human Serum Albumin; HSA)

อัลบูมินเป็นโปรตีนที่สำคัญชนิดหนึ่งถูกสร้างจากเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือดมีปริมาณ 50-60% ของโปรตีนทั้งหมด มีโครงสร้างเป็นก้อนกลม (globular proteins) ละลายน้ำได้ สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่สังเคราะห์อัลบูมินได้เองในร่างกาย โดยอัลบูมินที่อยู่ในไซขาวมีลักษณะใกล้เคียงกับอัลบูมินในเลือดมนุษย์มากที่สุด จากการศึกษาในระดับโมเลกุลของอัลบูมินในเลือด พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 585 ลำดับ น้ำหนักโมเลกุล 66 kDa มีอายุครึ่งชีวิตประมาณ 20 วัน ค่าปกติของอัลบูมินในเลือดอยู่ในช่วง 3.4 ถึง 5.4 g/dL ระดับของอัลบูมินในเลือดสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของตับ หน้าที่ของอัลบูมินคือช่วยขนส่งสารต่างๆ (transporter protein) ในเลือดเนื่องจากเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับสารได้หลายชนิด เช่น กรดไขมันอิสระ, บิลิลิบูบิน, สเตอรอยด์, ไทรอยด์ฮอร์โมน, แคลเซียม และยาชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการรักษาความเป็นกรดต่างของเลือด รักษาระดับความดันของเส้นเลือด (oncotic pressure) ระดับอัลบูมินจะลดลงในโรคตับเรื้อรัง เช่น ตับแข็ง นอกจากนี้ อาจจะลดลงในกลุ่มโรคไต (nephrotic syndrome) ซึ่งมีการสูญเสียอัลบูมินทางปัสสาวะ โภชนาการที่ไม่ดีหรือภาวะกระบวนการสลายโปรตีนบกพร่อง และการสูญเสียอัลบูมินทางผิวหนัง เช่น ผู้ที่ถูกไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก

2.4 กลไกการเกิดไมโครอัลบูมินูเรีย

โดยปกติ glomerular capillary wall (มีคุณสมบัติเป็น anionic macromolecule) จะมีกลไกในการยับยั้งการรั่วของอัลบูมินที่มีประจุเป็นลบออกทางปัสสาวะ โดยใช้คุณสมบัติของขนาดและประจุเพื่อกีดขวางไม่ให้อัลบูมินเล็ดลอดออกไปได้ แต่จากการศึกษาในผู้ป่วยเบาหวานที่มี microalbuminuria พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของรูขนาดใหญ่ (large pores) ทำให้การกีดขวางโดยขนาดลดลง นอกจากนี้ยังมีการลดลงของสาร heparan sulfate บน glomerular capillary wall ซึ่งเป็นประจุลบที่สำคัญในการกีดขวางโดยใช้ประจุทำให้เกิดการผลักรวมประจุลบด้วยกันอย่าง เช่น อัลบูมินไม่ให้เล็ดลอดออกไปได้ ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้จะรุนแรงมากขึ้นในผู้ป่วยที่เป็น overt nephropathy ซึ่งจะมีการรั่วของโปรตีนอัลบูมินมากกว่า 300 mg ต่อวัน (macroalbuminuria) (49, 50) นอกจากนี้

พบว่าจำนวนและความหนาแน่นของ podocyte cell ใน glomerulus ลดลง โดยจำนวนหรือความหนาแน่น podocyte cell ที่ลดลงสัมพันธ์กับปริมาณ UAE ที่เพิ่มขึ้น

ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าทำให้ยาในกลุ่ม Renin-angiotensin-aldosterone system blockers เช่น angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI), angiotensin II receptor

blockers และ direct renin inhibitors ซึ่งเป็นกลุ่มยาลดความดันโลหิตสูง จะมีผลช่วยลดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะในรายที่มีการตรวจพบภาวะไมโครอัลบูมินนูเรีย และสามารถชะลอการเสื่อมของไตได้แต่การรักษาด้วยยาในกลุ่มนี้ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลาอันยาวนานอาจมีผลข้างเคียงอื่นๆตามมา ดังนั้นการตรวจไมโครอัลบูมินคัดกรองในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงแต่เริ่มเป็นการป้องกันกำเริบของโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ดีที่สุด (51)

2.5 ภาวะไมโครอัลบูมินนูเรีย (Microalbuminuria)

คือภาวะที่มีการขับอัลบูมินออกทางปัสสาวะ (UAE) ในปริมาณระหว่าง 30 -299 มิลลิกรัมต่อวันหรือตรวจค่าอัลบูมินต่อครีเอตินีน (urinary albumin creatinine ratio: ACR) อยู่ในช่วง 30 – 299 มิลลิกรัมต่อกรัมครีเอตินีน และจะต้องตรวจพบ 2 ใน 3 ครั้งของปัสสาวะที่เก็บต่างเวลากันภายในระยะเวลา 3-6 เดือน ภาวะนี้สามารถบ่งชี้ถึงการเสื่อมหน้าที่ของไตในระยะเริ่มแรกและความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (cardiovascular disease) จากภาวะเสื่อมของหลอดเลือดฝอยทั่วร่างกาย (capillary inflammation) (16, 52)

ในภาวะร่างกายปกติจะไม่พบอัลบูมินในปัสสาวะเนื่องจากจะถูกกรองและดูดกลับโดย glomerulus, proximal convoluted tubule ในไตตามลำดับ แต่ในภาวะที่ไตถูกทำลายจะมีอัลบูมิน

ปริมาณน้อยๆ รั่วออกมาในปัสสาวะ พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่ไตถูกทำลายจากการเป็นโรคเบาหวาน (53, 54) และโรคอื่นๆ ที่สามารถทำลายไต เช่น ความดันโลหิตสูง (high blood pressure), หัวใจล้มเหลว (heart failure), ตับแข็ง (cirrhosis) หรือ โรค systemic lupus erythematosus (SLE) ได้ แสดงว่าเกิดความเสียหายขึ้นกับไตอย่างรุนแรง และนำไปสู่โรคไตวายชนิดเรื้อรังได้ (chronic kidney disease) (55-57)

2.6 วิธีรายงานผลการตรวจวัดเชิงปริมาณ (quantitative) จาก microalbumin ในปัสสาวะ สามารถทำได้ 3 วิธี คือ

1. การตรวจจากปัสสาวะที่สุ่มตรวจครั้งเดียวซึ่งนิยมเก็บปัสสาวะหลังจากปัสสาวะครั้งแรกในช่วงเช้า (first morning urine, spot urine) เพื่อหาสัดส่วนปริมาณอัลบูมินต่อปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ (urinary albumin creatinine ratio: ACR) รายงานผลในหน่วย mg/g creatinine

2. การตรวจจากปัสสาวะ 24 ชั่วโมงเพื่อหาปริมาณอัลบูมินทั้งหมดที่ถูกขับออกไปทางปัสสาวะในช่วง 1 วัน เช่น urine albumin excretion rate (UAE) รายงานผลในหน่วย mg/day

3. การตรวจจากปัสสาวะที่เก็บในช่วงเวลาเฉพาะ (timed collection) แต่ไม่ครบ 24 ชั่วโมง เช่น เก็บในระยะเวลา 4 ชั่วโมงหรือเก็บข้ามคืน เพื่อคำนวณหาอัตราการขับอัลบูมินที่ออกไปทางปัสสาวะต่อ 1 หน่วยเวลา (albumin excretion rate : AER) รายงานผลในหน่วย $\mu\text{g}/\text{min}$ วิธีที่นิยมมากที่สุดในการตรวจหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเพื่อรายงานผลคือหาค่า ACR โดยนับเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อลดปัจจัยที่อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อน เช่น อายุ เพศ เชื้อชาติ ซึ่งอายุที่เพิ่มขึ้นและเพศชายอาจทำให้ค่าอัลบูมินในปัสสาวะสูงได้ (16, 58, 59)

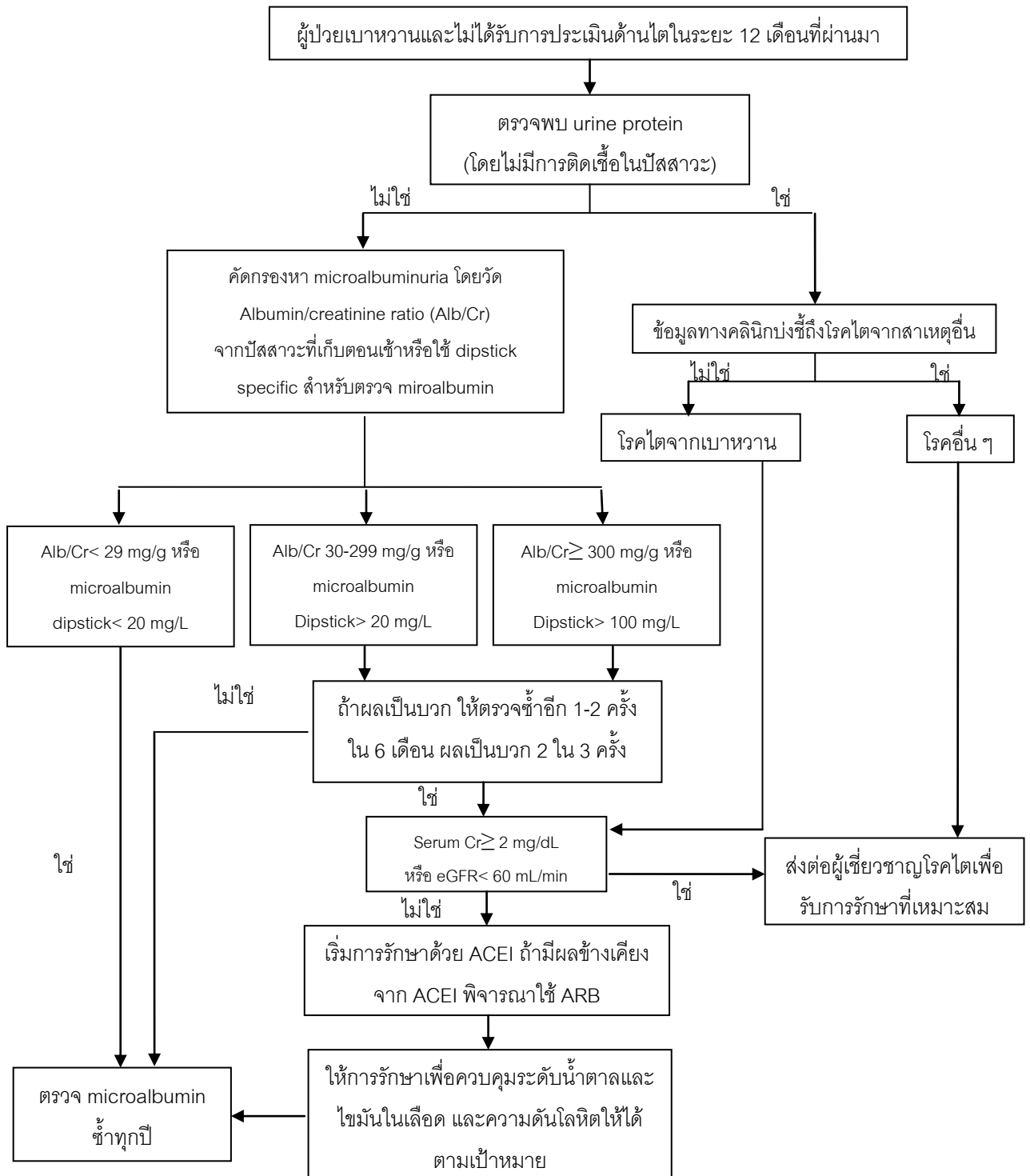
จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแบบสุ่ม (random urine) รายงานผลในหน่วย mg/L เพียงอย่างเดียวมีความไวและความน่าเชื่อถือเทียบเท่ากับการตรวจหาค่า ACR ซึ่งอาจมีความยุ่งยากมากกว่าเนื่องจากต้องตรวจหาค่าครีเอตินีนเพื่อนำมาคำนวณหาค่า albumin/creatinine ratio และช่วยลดการสิ้นเปลืองในการใช้น้ำยาตรวจวัดเพิ่มอีกด้วย (60-62) หรือในกรณีที่ไม่สามารถเก็บปัสสาวะผู้ป่วยให้ครบ 24 ชั่วโมงเพื่อตรวจ UAE ได้นั้น สามารถให้รายงานค่าอัลบูมินในปัสสาวะแบบสุ่มแทน (63-65)

2.7 ความสำคัญของการตรวจหา microalbumin ในปัสสาวะ

ตาม Kidney/Dialysis Quality Initiative (K/DOQI) ปี พ.ศ. 2550 (10) ได้นิยามโรคไตจากเบาหวานโดยอาศัยลักษณะทางคลินิก คือ การตรวจพบภาวะ proteinuria หรือ albuminuria และ/หรือ มีการทำงานของไตลดลง (glomerular filtration rate : GFR) ร่วมกับมีความดันโลหิตสูงมากกว่า 130/80 มิลลิเมตรปรอท ดังนั้นการตรวจหาไมโครอัลบูมินจากปัสสาวะตั้งแต่ระยะเริ่มและต่อเนื่องในผู้ป่วยเบาหวานช่วยลดอัตราการตายจากภาวะแทรกซ้อนจากการดำเนินโรคได้ นอกจากนี้ยังเป็นการหาปัจจัยเสี่ยงในการดำเนินโรคของ ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย (end-stage renal disease :ESRD) ที่มักเสียชีวิตด้วยอาการแทรกซ้อนจากภาวะหัวใจหัวใจล้มเหลว

ขณะล้างไต ผู้ป่วยโรคหัวใจหลอดเลือด (66) และ ผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง ที่มีสาเหตุจากโรคไต และโรคหัวใจ (67-71) อีกด้วย

ข้อมูลจากแนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวานจัดทำโดยสมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทยปี พ.ศ. 2554 ได้กำหนดแนวทางการคัดกรองและวินิจฉัยโรคไตจากเบาหวานในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 ไปในแนวทางเดียวกันกับข้อบ่งชี้ของ American Diabetes Association ที่ให้ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ต้องตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะทุกปี ในรายที่เป็นโรคนานเกิน 5 ปีหรือเมื่อเข้าสู่วัยรุ่น และผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ต้องตรวจนับตั้งแต่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน อย่างต่อเนื่องทุกปี เพื่อสามารถติดตามการเสื่อมของไตอย่างมีประสิทธิภาพ

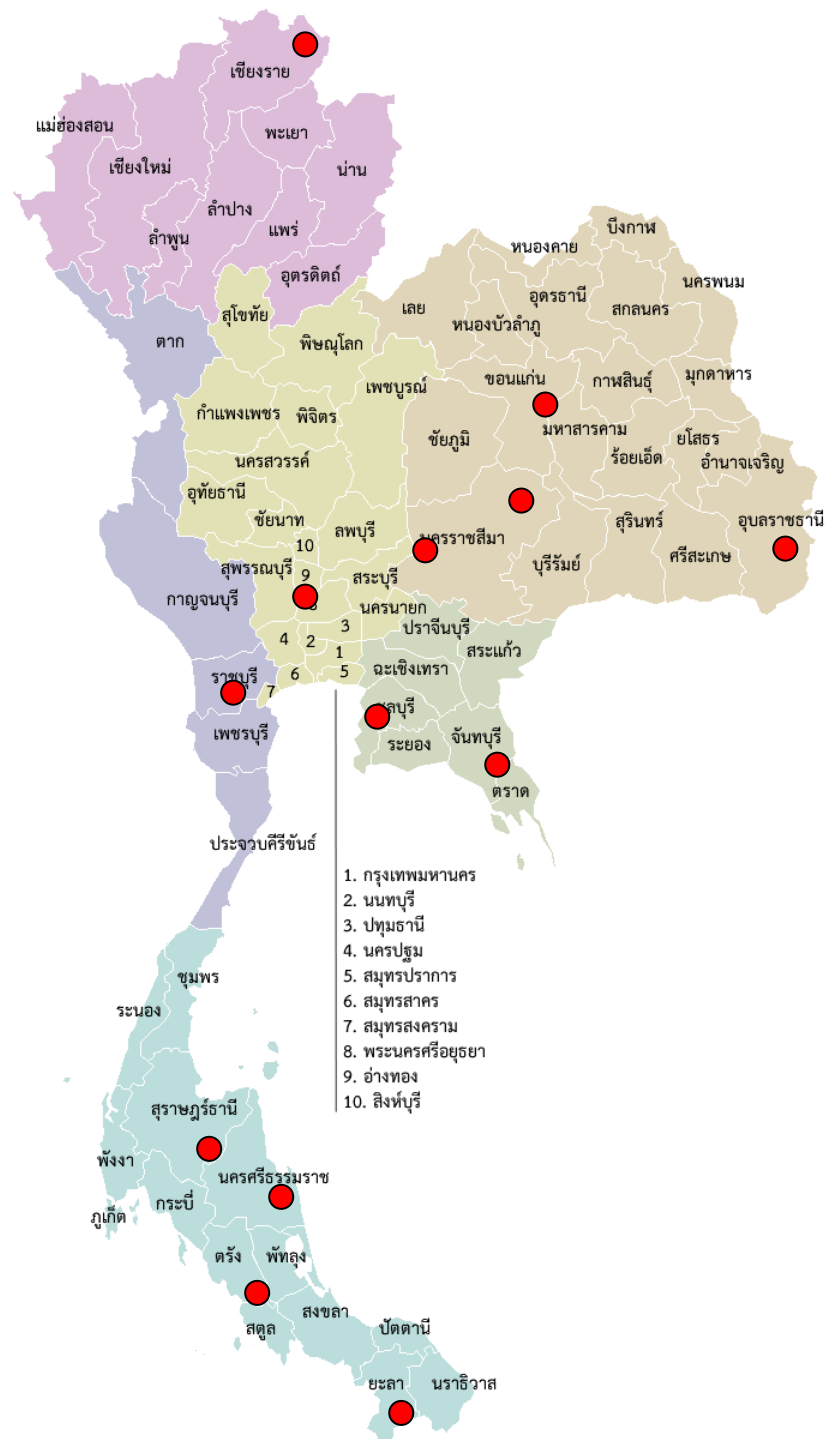


ภาพที่ 2.3 แนวทางการคัดกรองและวินิจฉัยโรคไตจากเบาหวานในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 (ข้อมูลจากสมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย, 2554)

2.8 ข้อจำกัดของการตรวจ microalbumin ในปัสสาวะ

เนื่องจากการตรวจหา microalbumin ในปัสสาวะเป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีราคาสูงกว่าการตรวจรายการอื่นๆในกลุ่มเดียวกันเมื่อเทียบจากอัตราค่าบริการของสถานบริการสาธารณสุขในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2547 คือมีราคา 270 บาท และเป็น monitoring parameter ที่บอกการพยากรณ์โรค และผลการตรวจจะเป็นประโยชน์ในรายที่สามารถปรับการรักษาให้ได้ตามแนวทางการป้องกันจากแพทย์เท่านั้น ดังนั้นสถานพยาบาลบางแห่งจึงไม่เห็นความสำคัญของการตรวจเท่าที่ควรเป็นเหตุให้ไม่มีการตรวจ microalbuminuria ในห้องปฏิบัติการหรือนิยมตรวจหาปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ (proteinuria) ซึ่งมีราคาถูกลงกว่า (50 บาท) เพื่อคัดกรองในวงกว้างแทนและพิจารณาคัดกรองหา microalbuminuria เฉพาะในกลุ่มเสี่ยงที่คุมภาวะอื่นๆ เช่น การคุมระดับน้ำตาล ความดันโลหิตสูงยังไม่ได้ในขั้นต้นต่อไป

ข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2547 รายงานว่าการตรวจ microalbumin ในปัสสาวะเชิงปริมาณเป็นการตรวจที่ทำได้เฉพาะในโรงพยาบาลบางแห่งของรัฐ เช่น โรงพยาบาลของคณะแพทยศาสตร์ และโรงพยาบาลศูนย์ของกระทรวงสาธารณสุขจำนวน 13 แห่งทั่วประเทศเท่านั้น ทำให้แพทย์ผู้ทำการรักษาต้องพิจารณาปัจจัยด้านอื่นๆของผู้ป่วยอย่างรอบคอบ เช่น ปัจจัยเสี่ยงของผู้ป่วย, ปัจจัยด้านที่อยู่อาศัย, ความรุนแรงของโรค, ฐานะ และความเข้าใจของคนไข้ ก่อนที่จะส่งตรวจ microalbumin ในปัสสาวะ เพื่อประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วย



ภาพที่ 2.4 แสดงโรงพยาบาลศูนย์ในประเทศไทยที่สามารถตรวจหา microalbumin ในปัสสาวะได้

2.9 วิธีการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณ (quantitative method) ที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

Radioimmunoassay (RIA)

การตรวจหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดยใช้หลักการ RIA ในปี 1963 โดย Keen และ Chlouverakis (72) โดยใช้เทคนิค double antibody มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ถือเป็นจุดเริ่มต้นของการผลิตชุดน้ำยาตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะที่มี analytical range ประมาณ 0.8-80 mg/L และถือว่าวิธีนี้เป็น gold standard ที่ใช้ในการเปรียบเทียบค่า AER ด้วยเทคนิคอื่นๆตามมา ภายหลังพบว่าเทคนิค RIA ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลานานประมาณ 2 ชั่วโมงและไม่สะดวกต่อผู้ปฏิบัติงานเนื่องจากอันตรายจากสารกัมมันตภาพรังสีที่ใช้ในการตรวจวัด หลักการของวิธีนี้คือใช้อัลบูมินติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีชนิด ¹²⁵I ซึ่งให้รังสีแกมมา เป็นตัวแย่งจับกับอัลบูมินอิสระในปัสสาวะ อัลบูมินทั้งสองชนิดจะแข่งกันจับกับแอนติบอดีตัวแรกที่จำเพาะกับอัลบูมิน จากนั้นทำการแยกอัลบูมินที่ติดฉลาก (bound radiolabelled albumin) และไม่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี (free radiolabelled albumin) ออกจากกัน โดยเติมแอนติบอดีตัวที่สองคือ anti immunoglobulin antibody ลงไปจับทำให้เกิดการตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นแยกเพื่อนำตะกอนซึ่งมีส่วน bound radiolabelled albumin หลงเหลืออยู่ไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง γ -counter จากวิธีดังกล่าวนี้ปริมาณรังสีที่ตรวจวัดได้จะมีสัดส่วนผกผันกับปริมาณอัลบูมินอิสระในปัสสาวะ (73)

Radial immunodiffusion (RID)

การตรวจด้วยวิธี RID ใช้ครั้งแรกเพื่อการเรียนการสอนในงานวิจัยโดยใช้อุปกรณ์และชุดน้ำยาสำเร็จรูป เทคนิคของวิธีนี้อาศัยปฏิกิริยาจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี การตรวจด้วยวิธีนี้ใช้เวลาของผลนานเนื่องจากต้องมีการ incubate ระหว่างน้ำยาแอนติบอดีกับสิ่งส่งตรวจนานข้ามคืนจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจบริการผู้ป่วย หลักการของวิธีนี้คือผสมแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินลงใน agarose gel เพื่อให้มีการกระจายตัวตามพื้นราบแล้วเจาะหลุมแผ่น agarose gel จากนั้นเติมสิ่งส่งตรวจที่มีแอนติเจนลงไป แอนติเจนจะกระจายตัวออกโดยรอบเป็นวงเพื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีใน gel ทำให้เห็นเส้นตะกอนเป็นวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางของตะกอนวงกลมจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของแอนติเจนที่อยู่ในหลุมนั้น โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นของแอนติเจน แต่ในปัจจุบันสามารถอ่านค่าความเข้มข้น

ของสารได้โดยเครื่อง electronic RID plate reader ซึ่งมีความสะดวก ถูกต้องแม่นยำมากกว่า วิธีนี้ให้ค่า analytical range อยู่ในช่วง 6-89 mg/L

จากการวิจัยพบว่าวิธี RID ให้ค่าการตรวจวัดใกล้เคียงกับวิธี RIA มากที่สุด (74)

Immunonephelometry (NEPH)

การตรวจวัดโดยวิธีนี้อาศัยเครื่อง nephelometer ที่มี mercury lamp และ fluorometer filter เป็นส่วนประกอบหลักและน้ำยาสำหรับตรวจ microalbumin โดยใช้หลักการการกระเจิงแสง (light scattering) โดยอัลบูมินในปัสสาวะจะทำปฏิกิริยากับน้ำยาแอนติบอดีที่จำเพาะกันเกิดเป็น antigen-antibody complex ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเพิ่มเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ จากนั้นนำไปใส่ cuvette ที่มีลักษณะเฉพาะเพื่อวัดสัญญาณ scatter signal ที่ความยาวคลื่น 360 nm โดยวัดความเข้มแสงที่กระเจิงออกมาทำมุม 90° กับ ปฏิกิริยา antigen-antibody complex ที่อยู่ใน cuvette ค่าการกระเจิงแสงที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นต่อไป analytical range ของวิธีนี้อยู่ในช่วง 2-40 mg/L และใช้เวลาในการตรวจวัดประมาณ 15-30 นาที เนื่องจากวิธีนี้มีช่วงการเป็นเส้นตรงในการวัดไม่กว้างมากนักจึงทำให้เกิด antigen excess ได้บ้างในรายที่มีค่าอัลบูมินสูงมาก แก้ไขได้โดยการเจือจางสิ่งส่งตรวจก่อนนำมาวัดซ้ำอีกครั้ง (75)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะด้วยเทคนิค ELISA เป็นวิธีที่มีความไวและแม่นยำสูง ใช้อุปกรณ์ไม่มากและไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่ไม่มีศักยภาพใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงได้ หลักการคือตรึงแอนติบอดีหรือแอนติเจนบน solid phase เช่น microplate หรือ beads อำนวยผลจากปฏิกิริยาที่ substrate ย่อย สารตั้งต้นของเอนไซม์ที่ติดฉลากไว้ที่แอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของสีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือนำไปวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วย ELISA reader หรือ spectrophotometer ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิค competitive ELISA (76) โดยเติมปัสสาวะลงใน plate ที่มีการตรึงอัลบูมินไว้ที่ก้นหลุม ตามด้วย Horseradish peroxidase conjugated-goat anti-human albumin (GAA-HRP) วิธีนี้มีความรวดเร็วกว่าเดิมเนื่องจากลดเวลาการ incubate และขั้นตอนการล้างปฏิกิริยาส่วนเกินออก อย่างไรก็ตามรวมระยะเวลาการทำในทุกขั้นตอนประมาณ 1 -1.5 ชั่วโมงและมีค่า

between run ค่าอนช่วงสูงคือ 9.9-13.2 % วิธีนี้ให้ค่า analytical range อยู่ในช่วง 0.9-200 mg/L (24)

Immunoturbidimetry (IT)

เทคนิคนี้เป็นที่นิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากค่าที่รายงานผลในการตรวจวัดมีความใกล้เคียงกับวิธี RIA (73) สามารถเลือกใช้เครื่องมือได้ทั้งระบบ manual เช่น spectrophotometer หรือระบบ automatic ที่มีให้เลือกหลากหลายตามขนาดของห้องปฏิบัติการ ตรวจวัดง่าย ทำได้ต่อเนื่องในระบบ batch จึงมีความรวดเร็วในการรายงานผล หลักการนี้อ่านค่าจากการดูดกลืนแสง (absorbance) ในสารละลายที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับ specific antibody (insoluble antigen-antibody complex) เทียบกับ blank แล้วนำค่า absorbance ที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นอัลบูมิน ความขุ่นในสารละลายจะแปรตามความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ ข้อจำกัดของหลักการนี้คืออาจเกิดอาจให้ผลลบลง (false negative results) ได้ในกรณีที่มีปริมาณอัลบูมินในส่งตัวอย่างมากเกินไป (antigen excess) แก้ไขได้โดยการเจือจางสิ่งส่งตรวจก่อนทำการตรวจวัดซ้ำ หลักการ IT เป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาน้ำยาในการตรวจวัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกันระหว่าง antigen-antibody เช่น การใช้แอนติบอดีที่มีความไวและจำเพาะมากขึ้น หรือนำ beads มาใช้ในการเพิ่มความไวในการเกิดปฏิกิริยา (28, 77, 78) วิธีนี้ให้ค่า analytical range อยู่ในช่วง 2-160 mg/L(79) ใช้ระยะเวลาในการตรวจวัดประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับเครื่องมือที่ใช้ (73)

Fluorescent immunoassay (FIA)

หลักการคือนำสี fluorescent มา labeled ไว้กับอัลบูมินที่ทราบความเข้มข้นเพื่อเป็นตัว detector และให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี fluorescent จากนั้นใส่ detector ลงไปในสิ่งส่งตรวจที่มีอัลบูมินอิสระเพื่อแย่งจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับอัลบูมิน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วนำไปอ่านค่า fluorescent intensity ด้วยเครื่อง laser fluorescence reader หน่วยของการรายงานผลเป็น relative fluorescence units (RFUs) ค่าความเข้มของสี fluorescent จะเป็นสัดส่วนผกผันกับความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ วิธีนี้ให้ช่วงของการตรวจวัดกว้างมากคือ 0-600 mg/L แต่ยังมีข้อจำกัดจากการรบกวนของความเป็นกรดต่างในปัสสาวะอยู่พอสมควร พบว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดเท่ากับ 6 จึงจะได้ผลดีที่สุด นอกจากนี้ราคาของสี fluorescent และ antibody ก็เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ต้นทุนการตรวจวัดมีราคาแพง (80)

2.10 วิธีการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณแบบต่างๆในงานวิจัยที่ผ่านมา

Immunoresonance scattering spectral assay (81)

หลักการของวิธีนี้คือนำ goat anti-human albumin มาทำปฏิกิริยากับอัลบูมินในปัสสาวะในตัวกลาง buffer ที่มี pH 4.4 และ 75 mg/L PEG ผสมอยู่ ในสภาวะดังกล่าวจะเกิด immunocomplex particle เมื่อนำไปวัดค่า RS intensity ที่ความยาวคลื่น 488 nm จะเกิดเส้น spectrum เรียกว่าสัญญาณ resonance scattering peak ซึ่งความสูงของ resonance spectrum จะแปรตามความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ วิธีนี้ให้ค่า analytical range อยู่ในช่วง 0.03-0.96 mg/L ค่าต่ำสุดที่วัดได้คือ 0.02 mg/L

HPLC (82)

ใช้ความแตกต่างของขนาดโมเลกุลและรูปร่างสารที่ต้องการตรวจวัด ผ่าน column ชนิด size exclusion chromatography และใช้ phosphate buffer เป็น mobile phase โดยสารที่ต้องการตรวจวัดจะละลายในตัวทำละลายที่ใช้เป็น mobile phase และมีความสามารถในการยึดเกาะกับ stationary phase ที่อยู่ใน column HPLC แตกต่างกัน สารที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายแต่ยึดเกาะได้น้อยจะออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยกว่าแต่ยึดเกาะได้ดีจะแยกออกมาทีหลัง สามารถหาปริมาณของสารจากความสูงและพื้นที่ใต้กราฟเรียกว่า chromatogram วิธีนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงสูงถึง 963 mg/L ค่าต่ำสุดที่วัดได้คือ 6.1 mg/L ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะมีความไวและความแม่นยำในการตรวจวัดดีมากแต่มีโอกาสเกิดผลบวกหลงได้ง่ายเช่นกันในกรณีที่มีสารชนิดอื่นที่มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับอัลบูมินปะปนมาในปัสสาวะทำให้เกิดการซ้อนทับกันของ peak บน chromatogram ได้จึงต้องให้ผู้มีประสบการณ์หรือมีความเชี่ยวชาญอ่านค่าก่อนรายงานผลทุกครั้ง

Protein chip electrophoresis (83)

ใช้สาร sodium dodecyl sulfate จับกับอัลบูมินจากนั้นเติม Fluorescent dye ลงไปจับกับ sodium dodecyl sulfate อีกทีเกิดเป็นสารละลายที่ให้สี fluorescence จากนั้นนำไปผสมกับ chicken albumin internal calibrator แล้วนำไปหยดลงในหลุมบน electrophoresis chip ซึ่งมี

chip ละ 10 หลุม หลังจากปล่อยกระแสไฟฟ้าและเกิดแถบโปรตีนสมบูรณ์แล้ว จึงนำไปวัดปริมาณของอัลบูมินด้วยแสงเลเซอร์ วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง 5-300 mg/L ค่าต่ำสุดที่วัดได้คือ 5 mg/L สามารถตรวจวัดได้ 30 นาทีต่อ 1 chip เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี HPLC แล้วพบว่าวิธีการตรวจวัดนี้ถูกรบกวนจากโปรตีนตัวอื่นในปัสสาวะที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกัน เช่น α 1-acid glycoprotein, α 1-antitrypsin และ transferrin

Piezoelectric immunosensors (84)

นำแผ่น Piezoelectric crystal มาเคลือบด้วย monoclonal antibody (AL-01) ในกรณีวัดแบบ direct assay หรือเคลือบด้วย human serum albumin ในกรณีวัดแบบ competitive assay จากนั้นวัดค่าการเกิดปฏิกิริยาจาก affinity interaction ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ในหน่วย kinetic association rate constant (ka) ค่า ka ที่สูงขึ้นจะแปรตามปริมาณอัลบูมินที่จับกับแอนติบอดีบน Piezoelectric crystal วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง 1-5 μ g/mL ใช้เวลาในการตรวจ sample ละ 17 นาที

A liposomal immunoassay (85)

พัฒนาจากหลักการ homogenous colorimetric immunoassay แต่ใช้ complement-mediated immunolysis of liposome ผสมด้วยสี sulphorhodamine B จับกับด้าน Fc ของแอนติบอดีเพื่อเพิ่มความไวในการเกิดปฏิกิริยาแบบ sandwich-type format อ่านค่าด้วยเครื่อง Cobas bio analyzer (Roche, Welwyn Garden City, UK) วิธีนี้ให้ค่า correlation กับวิธี RIA เป็นที่ยอมรับได้ ($r=0.94$)

Magnetic immunoassay (86)

ใช้ polyclonal rabbit anti-human albumin ตรึงบน silica microparticles (solid phase) เป็น capture antibody และใช้ monoclonal mouse anti-human albumin ตรึงบน dextran-coated nanoscaled superparamagnetic particles เป็น detection antibody เมื่อนำปัสสาวะมาผสมแบบ invert กับ buffer และสารที่กล่าวมาข้างต้นแล้วตั้งทิ้งไว้ 6 นาทีเพื่อให้ silica microparticles ตกลงไปที่ก้นหลอด จากนั้นนำหลอดที่มีส่วนของ superparamagnetic particles ที่จับกับอัลบูมินลอยอยู่ด้านบนนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง magnetic permeability detector วิธีนี้ใช้เวลาอ่านผล 6.5 นาที analytical range อยู่ในช่วง 0-400 mg/L ค่าต่ำสุดที่วัดได้คือ 5 mg/L

A molecularly imprinted polymer (MIP)-quartz crystal microbalance (QCM) sensor (87)

เป็นการประยุกต์หลักการ quartz crystal microbalance มาใช้ร่วมกับ immunosensor array โดยเคลือบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารที่ต้องการตรวจวัดลงบนผิว quartz crystal ที่วางไว้ใน detection array อีกที จากนั้นเมื่อหยดสิ่งส่งตรวจลงไปบนผิว quartz crystal แล้วอัลบูมินจะจับกับแอนติบอดีทำให้เกิดการสั่น (frequency shift) ความถี่ของการสั่นจะแปรตามความเข้มข้นของอัลบูมินในสิ่งส่งตรวจ วิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะได้พร้อมกันถึง 4 ชนิด คือ microalbumin, α -1microglobulin, β 2-microglobulin และ IgG ใช้เวลาในการตรวจวัด array ละ 15 นาที มีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.05-40 mg/L ถือได้ว่าเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความแม่นยำสูงและไม่ต้องใช้สาร fluorescent ในการติดฉลากซึ่งมีราคาแพง

Fluorescent dye method (AB580) (88, 89)

การใช้สี fluorescent ชนิด AB 580 ที่มีความจำเพาะกับอัลบูมินจับกับอัลบูมินเกิดการวาวแสง fluorescent ที่มีความเข้มข้นสูงแล้วนำไปอ่านค่าความเข้มของสีโดย spectrophotometer หรือเครื่องอ่านค่าของสี fluorescent โดยความเข้มข้นของอัลบูมินจะคำนวณจาก emission intensity ที่ความยาวคลื่น 616-630 nm แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานอัลบูมิน วิธีนี้ให้ช่วงค่าตรวจวิเคราะห์ 2-200 mg/L ค่าต่ำสุดที่วัดได้ 1.4 mg/L ค่า correlation กับวิธี nephelometric ดีมาก ($r = 0.989$) วิธีนี้ไม่ค่อยถูกรบกวนจากสารอื่นๆ เช่น ยา และโปรตีนอื่นๆมากนัก แต่การตรวจด้วยวิธีนี้ต้องควบคุม pH ของปฏิกิริยาให้คงที่และสมดุล เนื่องจากมีผลต่อการตรวจวัด ปัจจุบันมีการนำหลักการด้าน Fluorescent dye method มาประยุกต์ใช้ในระบบของไหลจุลภาค (microfluidic system) (90, 91), sequential injection analysis (92) เพื่อลดขนาดเครื่องมือและสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ ทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้ antibody และน้ำยาอื่นๆ ที่มีราคาแพงได้

2.11 การตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะด้วยหลักการ latex immunoassay

การนำ particle มาใช้ในปฏิกิริยาตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ 1982 โดย GC Viberti และ D Vergani (93) โดยใช้หลักการ agglutination test ซึ่งการนำ latex beads มาใช้จะช่วยให้เห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มอย่างชัดเจนมากขึ้น หลักการคือนำ rabbit anti-human albumin มาตรึงบน latex beads เมื่อหยดปัสสาวะที่มีอัลบูมินลงไปจะเกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มและตกตะกอนให้เห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถรายงานผลได้ใน 5 นาที ถือเป็นวิธีการตรวจแบบ screening method ของอัลบูมินในปัสสาวะครั้งแรกและเป็นจุดเริ่มต้นของการนำ particles มาใช้ในการตรวจวัดอัลบูมินโดยหลักการ immunoassay

ในปี ค.ศ.1985 โดย CE morganson และคณะ (94) ใช้หลักการ latex particle agglutination inhibition reaction มาใช้ในการตรวจวัดด้วยวิธีที่ง่ายแต่มีความจำเพาะมากขึ้น คือนำแอนติบอดีที่จำเพาะกับอัลบูมินมาผสมกับปัสสาวะให้เกิด antigen-antibody complex ก่อนจากนั้นจึงเติม latex beads ที่เคลือบด้วยอัลบูมินลงไปแย่งจับ ซึ่งปริมาณอัลบูมินที่เพิ่มขึ้นในปัสสาวะจะเป็นตัวบ่งชี้การจับกันระหว่างแอนติบอดีและ latex beads จึงเห็นปฏิกิริยาเกาะกลุ่มน้อยลง อ่านค่าเทียบกับ negative control บนแผ่นกระเบื้อง

การตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณโดยใช้หลักการ latex immunoassay ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ.1982 โดย A.Bernard และ R.Lauwerys (78) วิธีการคือนำ rabbit anti-albumin immunoglobulin มาตรึงบน latex beads จากนั้นนำปัสสาวะที่เจือจางแล้วเติมลงไปผสมให้เข้ากันใน glycine buffer pH 10 นำไปตั้งทิ้งไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจึงผสมให้เข้ากันอีกครั้งก่อนนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง particle counting ปริมาณ fraction of free latex particles ที่เหลือในสารละลายเป็นสัดส่วนผกผันกับความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ วิธีนี้ให้ค่าความเป็นเส้นตรง 25-800 µg/mL ค่า between run และ within run อยู่ในช่วง 8.2-11.6 % และค่า correlation coefficient กับวิธี nephelometry เท่ากับ 0.96

ในปี ค.ศ.1988 โดย C.L. Cambiaso และคณะ (28) ใช้หลักการ latex particle agglutination inhibition reaction เพื่อลด hook effect จาก antigen excess โดยนำปัสสาวะที่เจือจาง 10 เท่าใน glycine buffer saline มาผสมกับ goat anti-human albumin และ incubate 2 นาที จากนั้นเติม latex beads ที่เคลือบด้วยอัลบูมินลงไปผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาทีขั้นตอนนี้ทำหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม glycine buffer saline ลงไปแล้วนำไปเข้าเครื่อง particle counting เพื่ออ่านค่า ปริมาณ free particles ที่เหลืออยู่ในสารละลายแปรผันตาม

ความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ วิธีนี้ให้ช่วงค่าความเป็นเส้นตรง 6.25-50 mg/L ค่าต่ำสุดที่วัดได้คือ 0.4 mg/L ค่า between run และ within run อยู่ในช่วง 1.6-9.5 % และค่า correlation coefficient กับวิธี nephelometry เท่ากับ 0.996

ในปี ค.ศ.1990 โดย E.A.Medcalf และคณะ (95) พัฒนาการตรวจวัดโดยใช้หลักการ particle-enhance turbidimetric immunoassay โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติในการควบคุมและประมวลผลยี่ห้อ Multistat III microcentrifugal analyzer (Lexington, MA) การทำงานของเครื่องคือดูด beads ขนาด 40 nm ที่ตรึงด้วย goat anti-human albumin IgG มาผสมกับปัสสาวะใน phosphate buffer pH 7.4 และ incubate ที่ 30°C เมื่อครบเวลาเครื่องจะผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันอีกครั้งก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงทันทีที่ 340 nm และนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงอีกทีหลังจากนั้น 4 นาทีเพื่อหาค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราการดูดกลืนแสง (absorbance change) วิธีนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินกว้างถึง 200 mg/L ค่า intra และ inter assay น้อยกว่า 5% และ 10% ตามลำดับและค่า correlation coefficient กับวิธี RIA เท่ากับ 0.99 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับหลักการทาง non -particle-enhance turbidimetric immunoassay โดยใช้แอนติบอดีชนิดเดียวกันและปริมาณเท่ากันพบว่าวิธีที่มี particles ช่วยเพิ่มความไวในการเกิดปฏิกิริยาและขยายช่วงความเป็นเส้นตรงให้กว้างขึ้นอย่างเห็นได้ชัดกว่าวิธีที่ไม่ใช้ particles ในปฏิกิริยา

ซึ่งในปี 2009 W. Laiwattanapaisal และกลุ่ม (96) ได้พัฒนาต้นแบบการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในระบบของไหลจุลภาคโดยใช้หลักการ particle enhanced agglutination assay เป็นการลดปริมาณน้ำยาและสิ่งส่งตรวจได้เป็นอย่างมาก วิธีนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงถึง 10 mg/L ค่าต่ำสุดที่วัดได้คือ 0.81 mg/L พบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดคือสามารถพบ hook effect หรือ post-zone phenomenon (21) ได้ในกรณีที่มีปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะมากกว่า 10 mg/L

2.12 งานวิจัยต่างๆที่ใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA)

หลักการ PETINIA ถูกพัฒนาขึ้นจากหลักการ latex particle agglutination inhibition reaction ซึ่งมีพื้นฐานมาจากปฏิกิริยา competitive binding assay ใช้ครั้งแรกในการตรวจเชิงคุณภาพเพื่อหาฮอร์โมน HCG ในปัสสาวะ ถ้ามีการจับกลุ่มกันระหว่าง antigen coated particles กับ antibody แล้วเกิดการตกตะกอนให้เห็นที่ก้นหลุมบน microtiter well แสดงว่าไม่มีฮอร์โมน HCG ในปัสสาวะถือว่าไม่มีการตั้งครรภ์ การอ่านผลต้องเปรียบเทียบกับหลุม positive และ negative control ด้วยทุกครั้ง ในทางกลับกันหากมี HCG ในปัสสาวะจะไม่เกิดการจับกลุ่มของ particles และตกตะกอนให้เห็น จากนั้นจึงมีนักวิจัยนำหลักการ PETINIA มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ดังนี้

ปี ค.ศ. 1984 KE Opheim และคณะ (97) ตรวจหาระดับยา theophylline ใน serum โดยใช้เครื่อง Du pont aca หลักการคือนำ theophylline มาตรึงบน latex particles ด้วยหลักการ covalent แล้วเติมลงไปในการละลายที่มีส่วนผสมระหว่าง serum กับ monoclonal antibody ต่อ theophylline เพื่อแย่งจับ monoclonal antibody ที่เหลือจากปฏิกิริยาแรก แล้วนำไปวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่ 340 nm โดยใช้เครื่อง Du pont aca วิธีนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 2-40 mg/L, between run และ within run <4.7% และ <3.6% ตามลำดับและค่า correlation coefficient กับวิธี HPLC เท่ากับ 0.995 ข้อดีของวิธีนี้คือใช้ปริมาณ serum น้อยเพียง 40 μ L สะดวกสำหรับแพทย์หรือพยาบาลที่ต้องเจาะเลือดเด็กซึ่งอาจได้ปริมาณเลือดน้อยกว่าผู้ใหญ่

ปี ค.ศ. 1985 G Gotelli และคณะ (98) ตรวจหาระดับยา theophylline ใน serum เช่นกัน โดยใช้เครื่อง centrifugal analyzer แต่ครั้งนี้นักวิจัยได้ใช้ชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป PETINIA theophylline kit, Du pont แทนการเตรียมน้ำยาเองเพื่อลดความผิดพลาดต่างๆที่เกิดจากการปนเปื้อนหรือการเจือจางสารละลายต่างๆ วิธีนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 3-40 mg/L, between run และ within run <7.0% และ <4.6% ตามลำดับและค่า correlation coefficient กับวิธี HPLC เท่ากับ 0.987 งานวิจัยนี้เป็นการทดสอบว่าหลักการ PETINIA สามารถนำไปใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติแบบอื่นๆได้

ปี ค.ศ.1997 H Thakkar และคณะ (33) ตรวจหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้เครื่อง Dade aca® analyzer หลักการคือนำ human serum albumin (HSA) มาตรึงบน 40 nm latex particles ด้วยหลักการ covalent แล้วเติมลงไปในการละลายใน 150 mM phosphate buffer, pH 7.8 ที่มีส่วนผสมของปัสสาวะ กับ monoclonal antibody ต่อ HSA เพื่อแย่งจับ monoclonal antibody ที่

เหลือจากปฏิกิริยาแรก แล้วนำไปวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่ 340 nm โดยใช้เครื่อง Dade aca® analyzer วิธีนี้ให้ช่วงค่าการตรวจวัดอัลบูมิน 2-250 mg/L, ค่าต่ำสุดที่วัดได้คือ 0.40 mg/L, between run และ within run <8.8% และ <6.0% ตามลำดับและค่า correlation coefficient กับวิธี nephelometric immunoassay เท่ากับ 0.995 ข้อเสียของวิธีนี้คือขั้นตอนการตรึง beads มีหลายขั้นตอนใช้เวลานานและต้องใช้สารเคมีหลายตัว, ใช้ปริมาตรปัสสาวะมากคือ 100 μ L ข้อดีของวิธีนี้คือ particles reagent มีความคงตัวดีทำให้ไม่มีความแตกต่างของค่าระหว่าง lot มากนัก และช่วงความเป็นเส้นตรงกว้างครอบคลุมภาวะ microalbuminuria จนแทบไม่ต้องมีการเจือจางสิ่งส่งตรวจ

ปี ค.ศ. 2005 F Parant และคณะ (99) ตรวจหาระดับยา carbamazepine ใน serum ผู้ป่วยจิตเวชโดยใช้เครื่อง EMIT2000 แล้วพบว่ายา hydroxyzine (HDZ) และอนุพันธ์ปริมาณสูงใน serum รบกวนการตรวจวัด carbamazepine โดยใช้หลักการ PETINIA โดยทำให้ผลการตรวจวัด carbamazepine สูงกว่าความเป็นจริงเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธี liquid chromatography ซึ่งมีความจำเพาะมากกว่า

ข้อดีของหลักการ PETINIA คือมีความไวในการตรวจวัดสารชีวภาพปริมาณน้อยๆ และไม่เกิด hook effect ในกรณี antigen excess ดังเช่นที่พบได้ทั่วไปในปฏิกิริยาทาง immunoassay บางประเภท เช่น nephelometric และ turbidimetric immunoassay (100)

2.13 หลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ

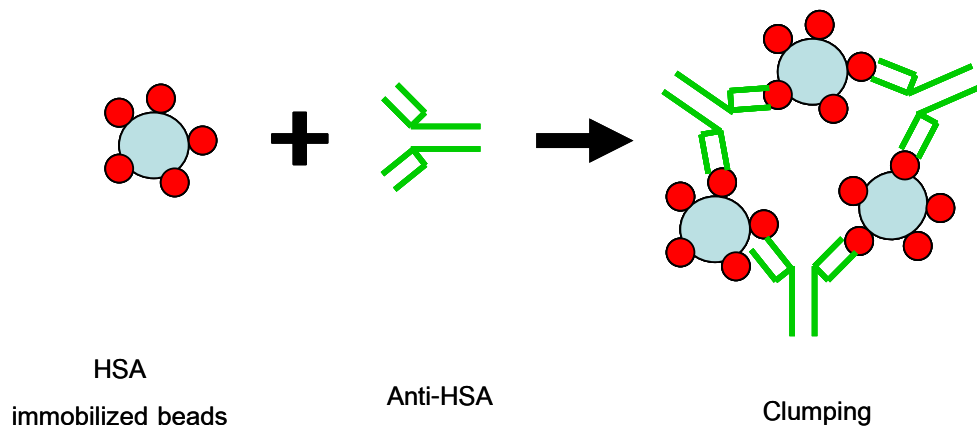
Test procedure

Urine + Anti-HSA $\xrightarrow{\text{Incubate}}$ HSA immobilized beads \longrightarrow Observe for clumping

Beads ที่เคลือบด้วย human serum albumin จะแย่งจับกับ antibody binding sites ที่เหลือจาก antigen - antibody complexes ในสารละลายที่มีปัสสาวะผู้ป่วยกับ anti-human serum

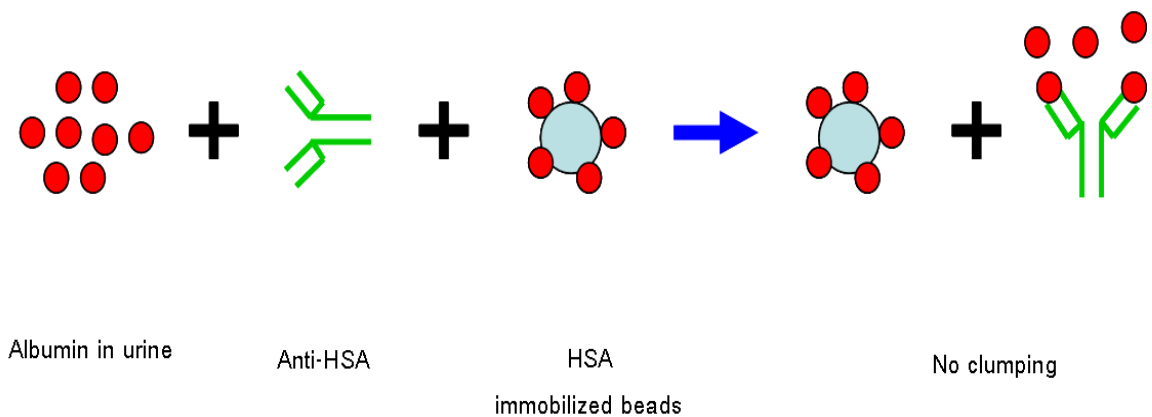
albumin ผสมกัน เกิดการเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาค beads กับ antibody ทำให้สามารถวัดอัตราดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm. อัตราการดูดกลืนแสงและจำนวนการเกาะกลุ่มของอนุภาคที่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนผกผันกับปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ

กรณีที่ไม่มีอัลบูมินในปัสสาวะ



ภาพที่ 2.5 กรณีที่ไม่มีอัลบูมินในปัสสาวะทำให้แอนติบอดีเหลืออิสระ จึงเกิดการเกาะกลุ่มระหว่าง particles กับแอนติบอดี สารละลายจึงขุ่นขึ้น อัตราการดูดกลืนแสงจึงเพิ่มขึ้น

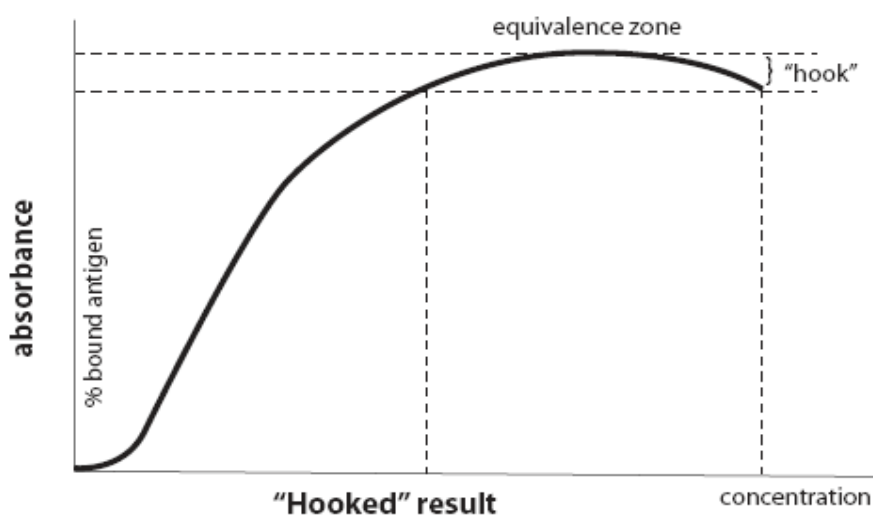
กรณีที่มีอัลบูมินในปัสสาวะ



ภาพที่ 2.6 กรณีที่มีอัลบูมินในปัสสาวะทำให้แอนติบอดีจับกับอัลบูมินจนหมด ไม่เหลือแอนติบอดีอิสระให้ particles แย่งจับ จึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มระหว่าง particles กับแอนติบอดี สารละลายจึงไม่ขุ่น อัตราการดูดกลืนแสงจึงน้อยลง

2.14 สภาวะรบกวนการเกิดปฏิกิริยา immunoassay จาก hook effect (antigen excess) (100)

การเกิด hook effect สามารถอธิบายได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี กล่าวคือเมื่อมีปริมาณสิ่งตัวอย่างมากเกินไปจนทำให้จับกับ binding site ของแอนติบอดีอย่างเต็มที่แต่ไม่เฉพาะเจาะจงเนื่องจากปฏิกิริยาแบบ single step immunoassay ส่วนใหญ่ซึ่งมีการ incubate สารต่างๆพร้อมๆกัน เช่น แอนติเจน แอนติบอดีและสารติดตามต่างๆ มักไม่มีขั้นตอนการล้างส่วนเกินออก ซึ่งทำให้เกิดการรบกวนปฏิกิริยา cross react จากข้อจำกัดของโครงสร้างของแอนติเจน แอนติบอดีได้ง่าย ผลจากการเกิด hook effect ทำให้ค่าที่ได้จากการตรวจวัดต่ำกว่าความเป็นจริงและไม่เป็นไปตาม linearity ของกราฟมาตรฐานอันเนื่องมาจากความเข้มข้นที่แท้จริงของสิ่งส่งตรวจมากกว่า upper standard แต่ปรากฏการณ์ดังกล่าวจะไม่เกิดในปฏิกิริยาแบบแข่งขัน (competitive immunoassay) เนื่องจากมีการนำ particles มาแย่งจับแอนติเจนส่วนเกินออกจาก antigen-antibody complex ในขั้นปฏิกิริยาขั้นตอนแรกที่เกิดสมดุลแล้ว รูปแบบการเกิด hook effect อธิบายได้จากภาพที่ 2.7 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงบริเวณ post-zone (antigen excess zone) มีลักษณะแบบเดียวกันกับบริเวณ pro-zone (antibody excess zone) ในกราฟรูปประซังค์ว่าเป็นเหตุให้สัญญาณการตรวจวัดอยู่ในช่วงปกติหรือต่ำกว่าความเป็นจริงจึงอาจทำให้เกิดการรายงานผิดพลาดในกรณีสิ่งตัวอย่างมีปริมาณมากเกินไปได้



ที่มา <http://www.biochemia-medica.com/content/interferences-quantitative-immunochemical-methods>

ภาพที่ 2.7 แสดงปรากฏการณ์ hook effect จากการมีสิ่งตัวอย่างมากเกินไป (excess antigen)

จากเหตุการณ์ดังกล่าวผู้ผลิตเครื่องมือและน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่ใช้หลักการด้าน turbidimetric immunoassay จึงแก้ปัญหาที่พบบ่อยนี้โดยการนำ particles มาใช้ในการแย่งจับ ปฏิกริยาส่วนเกินออก, เพิ่มขั้นตอนการล้างปฏิกริยาส่วนเกิน, ลดปริมาณสิ่งส่งตรวจให้น้อยลงหรือ เจือจางสิ่งส่งตรวจก่อนตรวจวิเคราะห์ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวจะถูกกำหนดให้ทำโดยอัตโนมัติจาก โปรแกรมคำสั่งที่ออกแบบไว้ในเครื่องมือตรวจวิเคราะห์

การทดสอบ hook effect อย่างง่ายคือการนำสิ่งตรวจที่สงสัยว่ามีความเข้มข้นของ แอนติเจนสูงมากมาเจือจางด้วยสารละลาย 10 -100 เท่าแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์เทียบกับค่าก่อน เจือจาง ถ้าค่าการตรวจวิเคราะห์หลังเจือจางเมื่อคูณ factor กลับแล้วมีค่ามากกว่าก่อนเจือจาง แสดงว่าเครื่องมือและน้ำยานั้นๆมีข้อจำกัดในด้านการตรวจวัดค่าที่มีความเข้มข้นสูง จึงควรรหาค่า cut off ที่เหมาะสมสำหรับวิธีตรวจวัดนั้นๆ และ dilution ที่เหมาะสมสำหรับการป้องกันการเกิด hook effect ในครั้งต่อไป

2.15 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกริยาแอนติเจน-แอนติบอดี (101)

อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิที่เหมาะสมมีผลต่อปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 4-40°C การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ธรรมชาติของโปรตีน, ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ epitope บนผิวแอนติเจนและชนิดของแรงดึงดูดทางเคมี เช่น การจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่เกิดจากพันธะ hydrogen bonds จะให้ปฏิกริยาดีที่ อุณหภูมิต่ำๆ เช่น 4°C (exothermal) โดยเฉพาะแอนติเจนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ในทางกลับกัน พันธะ hydrophobic จะแข็งแรงและจับกันได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยทั่วไปปฏิกริยาแอนติเจนกับ แอนติบอดีที่เกิดการสานกันเป็นร่างแหจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C เนื่องจากที่อุณหภูมิดังกล่าว จะมีค่า association constant (K) ลดลง ทำให้การจับกลุ่มระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี รวดเร็วและคงที่มากที่สุด แต่ถ้าอุณหภูมิสูงมากเกินไปโปรตีนจะเสียสภาพ (denature) และ คุณสมบัติเสียไป ในทางตรงกันข้ามถ้าอุณหภูมิต่ำจนเป็นน้ำแข็ง แอนติเจนกับแอนติบอดีก็จะไม่สามารถจับกันได้

ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ปฏิกิริยาแอนติเจนกับแอนติบอดีจะเกิดดีที่สุดที่สุดในสารละลายที่มี pH ในช่วง 6.5-8.4 หาก pH ของสารละลายมีสภาพเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปจะมีผลให้แอนติบอดีเสียสภาพ และจะทำลายองค์ประกอบของแอนติเจนด้วย การทำให้สารละลายเป็นกรดจะทำให้โปรตีนมีประจุเป็นบวกทั้งคู่จึงเกิดแรงผลักกัน ในทางตรงกันข้ามถ้าสารละลายเป็นด่างจะทำให้โปรตีนมีประจุเป็นลบทั้งคู่จึงเกิดแรงผลักกัน ดังนั้น pH ที่เหมาะสมที่สุดระหว่างปฏิกิริยาแอนติเจน แอนติบอดีคือต้องเป็นค่าเล็กน้อยประมาณ 7.2-7.4 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pH ของร่างกาย

ความเข้มข้นไอออน (Ionic strength)

ความเข้มข้นของไอออนหรือเกลือมีผลต่อปฏิกิริยาแบบ kinetic ของแอนติเจนและแอนติบอดี เช่น การลดความเข้มข้นของเกลือจาก 0.17 M เป็น 0.03 M จะทำให้เพิ่มอัตราการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีถึง 1000 เท่า โดยทั่วไปปฏิกิริยาทาง immunoassay จะเลือกใช้ buffer ที่มีความเข้มข้นไอออนอยู่ที่ 0.15 M (physiological saline) หรือ 0.9% NaCl (isotonic solution) เนื่องจากเป็นปริมาณเกลือที่ไม่มากหรือน้อยจนเกินไปที่จะทำลายคุณสมบัติของแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ ถ้าความเข้มข้นของเกลือน้อยเกินไปจะทำให้โอกาสการจับกลุ่มของโปรตีนลดลง หรือถ้าความเข้มข้นของเกลือมากเกินไปก็อาจทำให้เกิดการจับกลุ่มของเกลือเองได้ (salt agglutination) แม้ยังไม่ได้เติมแอนติบอดี

สัดส่วนระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Antigen-antibody ratio)

การสานกันเป็นร่างแหระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (lattice formation) เกิดจากสัดส่วนที่เหมาะสมของโปรตีนทั้งสองชนิดซึ่งปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่มากหรือน้อยจนเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ และคงที่ ซึ่งความเข้มข้นที่ดีที่สุดระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะมีเพียงความเข้มข้นเดียว หาได้จากการปรับความเข้มข้นของโปรตีนตัวใดตัวหนึ่งให้คงที่และค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนอีกตัวเพื่อสังเกตการจับกลุ่มหรือตกตะกอนที่มากที่สุด

แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (Electrostatic interaction)

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนั้น เกิดจากการใช้แรงจับกันอย่างอ่อน ๆ ซึ่งเป็น non-covalent bond ทั้งสิ้น ได้แก่ Electrostatic force (Coulombic force), Hydrogen bonding force, Hydrophobic force และ Van der Waals force ดังนั้นการลดแรงผลักรัหว่างประจุ หรือลดช่องว่างระหว่างโมเลกุลจึงช่วยเพิ่มการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีให้มั่นคงมากยิ่งขึ้น

ความเข้มข้นของโปรตีนบน particles

ปริมาณและการเรียงตัวของโปรตีนบน particles มีผลต่อการจับกันทางโครงสร้างของแอนติเจนหรือแอนติบอดี ตัวอย่างเช่น ถ้ามีปริมาณแอนติเจนบน particles มากเกินไปอาจเกิด cross-bridging กับ แอนติเจนด้วยกัน จึงอาจเกิด agglutination แบบไม่จำเพาะได้ หรือถ้ามีช่องว่างบนผิว particles มากเกินไปทำให้แอนติบอดีไม่สามารถจับได้อย่างเต็มที่ปฏิกิริยาจึงเกิดน้อยลง

ชนิดของแอนติบอดี

แอนติบอดีชนิด IgM มีลักษณะทางโครงสร้างแบบ pentamer จึงสามารถจับกับแอนติเจนได้ครั้งละ 10 ตำแหน่งทำให้เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มได้ดีกว่าชนิด IgG ซึ่งมีลักษณะเป็น monomer แต่แอนติบอดีชนิด IgM อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโปรตีนชนิดอื่นได้มากเช่นเดียวกัน ปัจจุบันนิยมใช้แอนติบอดีชนิด IgG ในปฏิกิริยาทาง immunoassay เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับแอนติเจน (agglutination) และตกตะกอน (precipitation) ได้ และผลิตได้ง่ายเนื่องจากเป็นแอนติบอดีที่มีปริมาณมากที่สุดใน serum

2.16 การตรึงโปรตีนบน beads (Adsorption to beads) (102)

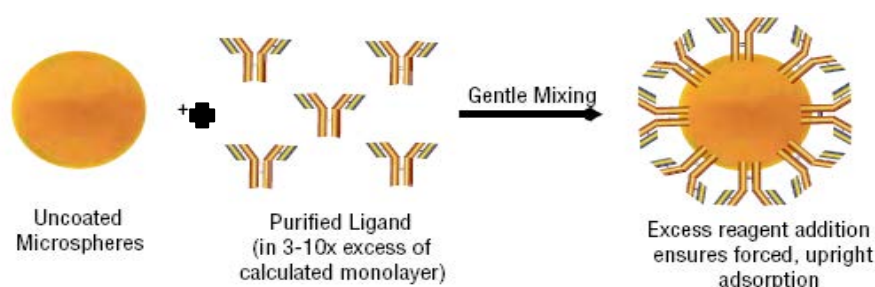
โปรตีนที่นำมาตรึงบน beads เพื่อใช้ในงานด้าน immunoassay มีทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของสารที่ต้องการตรวจวัดว่าสามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนหรือ ligand ของแอนติบอดีที่ตรึงบน beads ได้อย่างชัดเจน solid phase ที่นิยมนำโปรตีนมาตรึงเพื่อใช้ในงานด้าน particle enhance immunoassay ได้แก่ natural rubber or synthetic rubber latex, polystyrene latex และ polyvinyltoluene latex จากที่กล่าวมา polystyrene latex ถูกนำมาใช้บ่อยเนื่องจากเป็นสารสังเคราะห์ที่มีความหลากหลาย, มีความ

คงทน อายุการใช้งานยาวกว่าชนิดอื่น (103) การตรึงโปรตีนบน beads แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ passive adsorption และ covalent adsorption (chemical adsorption)

2.16.1 การตรึงแบบ passive adsorption

เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันมายาวนาน เนื่องจากขั้นตอนไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้สารเคมีมากและปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมของสารชีวภาพ จึงเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของผิว beads กับโปรตีนเป็นพันธะอย่างอ่อน เช่น hydrophobic interaction, Van der waals bonds จึงทำให้ immobilized beads จากการตรึงด้วยวิธีนี้ไม่ค่อยคงทนเมื่อเก็บเอาไว้เป็นระยะเวลานานเนื่องจากโปรตีนอาจหลุดลอกออกมา อายุการใช้งานโดยเฉลี่ยไม่เกิน 4 เดือน(104) หรือเกิด spontaneous aggregation และ non specific aggregation ได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH หรืออุณหภูมิ

การตรึงแอนติบอดีบน beads มีความยากมากกว่าการตรึงแอนติเจนเนื่องจากโครงสร้างของแอนติบอดีประกอบด้วยด้าน Fab ซึ่งเป็นด้านที่จะจับกับ epitope ของแอนติเจน และด้าน Fc receptor จะจับกับผิวของ beads ทำให้ต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้มีการเรียงตัวในทิศทางที่ถูกต้องและยังคงประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดี ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงโปรตีนด้วยวิธีนี้คือควรเลือกใช้ adsorption buffer ที่มี pH ใกล้เคียงกับ pI ของโปรตีนที่นำมาตรึงเพราะจะทำให้โปรตีนมีประจุเป็นศูนย์ไม่เกิดแรงผลักดันระหว่างโมเลกุลเองจึงสามารถเคลื่อนที่เข้าใกล้ผิว beads ได้ง่ายขึ้น, ปริมาณ ligands หรือโปรตีนที่นำมาตรึงควรพอดีกับพื้นที่ผิวของ beads, ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ incubate ต้องเหมาะสมและสารละลายโปรตีนที่นำมาตรึงควรมีความบริสุทธิ์สูงไม่ควรมีส่วนอื่นเจือปนเพราะจะรบกวนการตรึงได้



ที่มา Bangs Laboratories, Inc. TechNote 204 Rev. #002, Active: 09/April/2008

ภาพที่ 2.8 แสดงขั้นตอนการตรึงแอนติบอดีบน beads แบบ passive adsorption

2.16.2 การตรึงแบบ covalent adsorption (chemical adsorption)

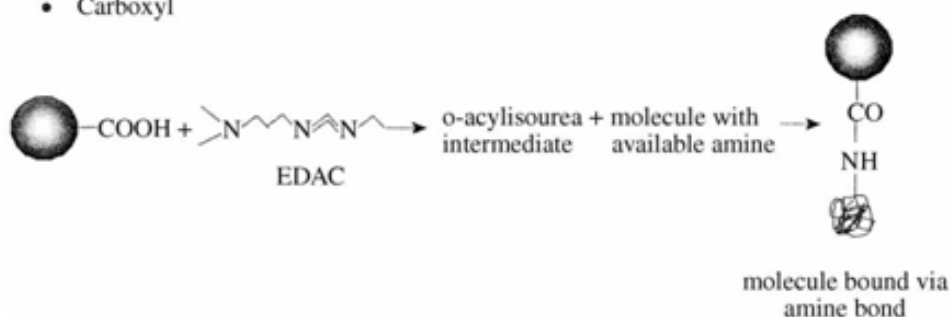
การตรึงโปรตีนบน beads แบบ covalent adsorption ช่วยแก้ปัญหาการไม่คงตัวของ immobilized beads และลด non-specific interactions ที่พบได้ในการตรึงโปรตีนแบบ passive adsorption การตรึง beads ด้วยวิธีนี้จะประกอบไปด้วยการใช้ beads ที่มี functional groups ชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของโปรตีนที่นำมาตรึงร่วมกับการใช้ cross-linking reagent เป็น spacer arm เพื่อยึดแขนของโมเลกุลโปรตีนออกไปจาก solid phase ให้เป็นอิสระมากขึ้นจึงเรียงตัวอย่างเหมาะสม ประโยชน์อื่นๆ ของการตรึงวิธีนี้คือ

1. เพิ่ม biological activity ของโปรตีนที่นำมาตรึง เพราะช่วยให้แอนติบอดีเรียงตัวกันอย่างเหมาะสมและแข็งแรงลดการ desorption ขณะ incubate ระหว่างการตรึง (105)
2. พันธะทางเคมีที่ใช้ตรึงมีความคงทนถาวรแม้ในขั้นตอนการปั่นล้างส่วนเกินระหว่างการตรึง
3. ลดการหลุดลอกของโปรตีนระหว่างการเก็บรักษา จึงเพิ่มอายุการใช้งานได้นานกว่า
4. ลดการเกิด false positive result จากปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกันเองเนื่องจาก non specific binding กับ ligands อื่นๆ
5. สามารถควบคุมคุณภาพการตรึงได้ง่ายเนื่องจากโปรตีนจะกระจายบนผิว beads เท่าๆกันตาม functional groups บนผิว beads
6. เหมาะสำหรับโปรตีนที่มีโครงสร้างไม่แข็งแรง ถูกทำลายได้ง่ายจากการปั่นล้าง ปฏิกิริยาส่วนเกินหรือ sensitive ต่อสารพวก surfactants ต่างๆ
7. กรณีที่ตรึงแอนติบอดี สามารถเติม protein A, protein G ลงไปจับกับ Fc ของแอนติบอดีให้ยึดติดกับผิว beads ได้ง่าย
8. จากงานวิจัยพบว่าการตรึงโปรตีนแบบ covalent ทำให้เกิดการยึดเกาะของโปรตีนมากกว่าวิธี passive adsorption 10-40% (106)
9. immobilized beads ด้วยวิธี covalent adsorption มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิมากกว่าวิธี passive adsorption

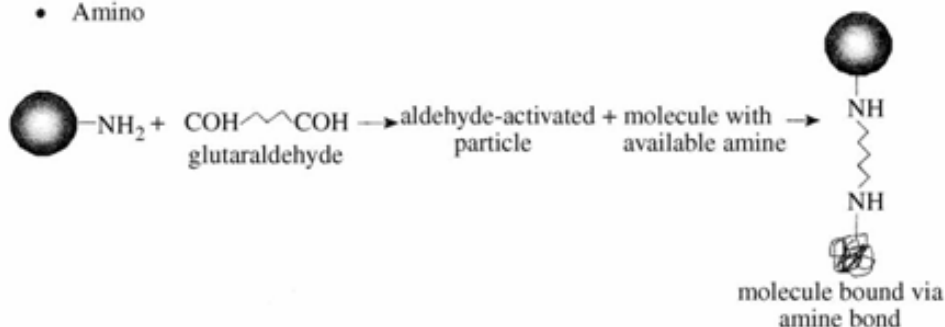
2.16.3 Functionalized beads ชนิดต่างๆที่นำมาใช้ในการตรึงแบบ covalent (102)

1. Carboxyl-Modified Microspheres ใช้ cross-linking reagent คือ Water soluble carbodiimide (WSC) ได้แก่ EDC และ CMC เป็นต้น
2. Amino-Modified Microspheres ใช้ cross-linking reagent คือ Amine reactive homo bifunctional cross-linker ได้แก่ glutaraldehyde, imidoesters และ NHS esters เป็นต้น

- Carboxyl



- Amino



ภาพที่ 2.9 แสดงการตรึงโปรตีนบน Functionalized beads ชนิด carboxyl และ amino groups

3. Hydroxyl-Modified Microspheres ใช้ cross-linking reagent คือ Cyanogen Bromide (CNBr)
4. Hydrazide-Modified Microspheres ใช้ cross-linking reagent คือ sodium *meta*-periodate (NaIO₄)
5. Chloromethyl-Modified Microspheres ไม่ต้องใช้ cross-linking reagent

Functionalized beads ที่นิยมนำมาใช้ตรึงโปรตีนคือ carboxyl และ amino groups เนื่องจากสามารถจับได้กับโครงสร้างปลายสายของโปรตีนเกือบทุกชนิด ที่มี amino terminal และ

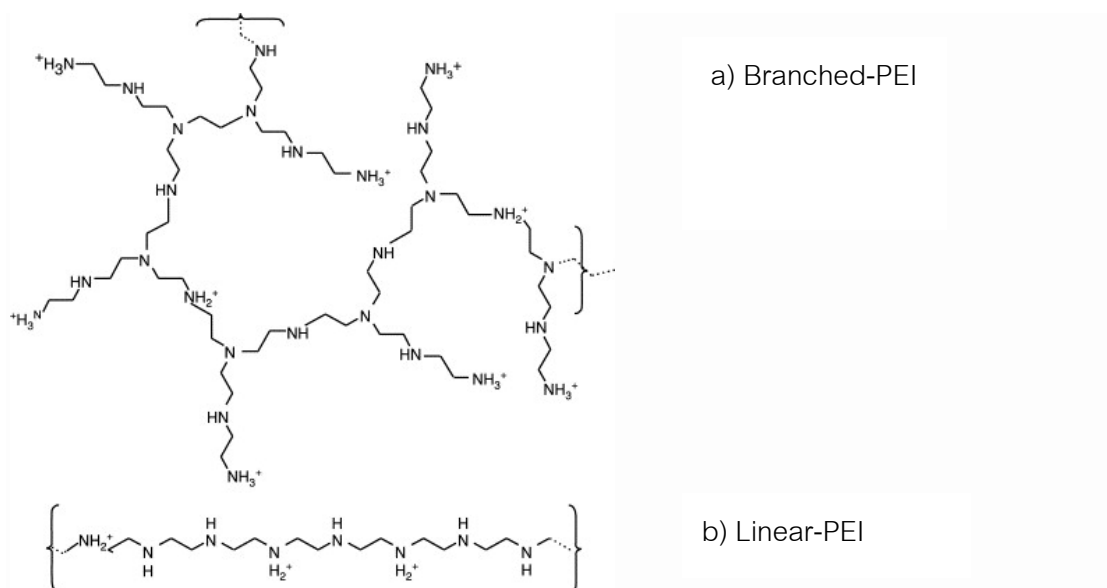
carboxyl terminal ทั้งยังใช้สาร covalent reagent ที่หาได้ง่ายและใช้กันอย่างแพร่หลายเช่น carbodiimide และ glutaraldehyde

นอกจากนี้ที่กล่าวมาข้างต้นแล้วการตรึงแบบ covalent สามารถนำมาใช้กับ Polymethyl Methacrylate (PMMA) microspheres และ Silica Microspheres (glass surface) ซึ่งนิยมนำไปรีดิวซ์ประเภท nucleic acids (oligonucleotides, PCR products) มาตรึงเพื่อใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆด้วย (107)

2.17 Polyethylenimine (PEI) (108)

เป็น polymer ที่ประกอบด้วย ethyleneimine monomer ประมาณ 85% มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 - 50,000 kD ซึ่งจะแตกต่างกันตามโครงสร้าง แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ Linear-PEI และ Branched-PEI ดังแสดงในภาพที่ 2.10 โครงสร้างของ Linear-PEI ประกอบด้วย secondary amine groups เรียงตัวกันเป็นสายยาว ส่วนโครงสร้างของ Branched-PEI ประกอบด้วย primary, secondary และ tertiary amino groups โดยสิ้นสุดปลายสายทุกๆ ด้านของ Branched-PEI มีโครงสร้างเป็น primary amino groups แต่ละจุดที่แตกเป็นกิ่งก้านสาขาเป็น tertiary amino groups และ secondary amino groups จะเรียงตัวเป็นสายเชื่อมระหว่างจุดที่แตกเป็นสาขาอีกที

ที่อุณหภูมิห้อง Linear-PEI จะมีคุณสมบัติเป็นของแข็ง แต่จะเปลี่ยนเป็นของเหลวเมื่อนำไปต้มที่อุณหภูมิ 73-75°C หรือนำไปละลายในตัวทำละลายเช่น methanol, ethanol และ chloroform แต่จะไม่ละลายในน้ำเย็น หรือตัวทำละลายบางชนิด เช่น benzene, ethyl ether และ acetone ส่วน Branched-PEI มีคุณสมบัติเป็นของเหลวละลายน้ำได้



ที่มา <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065266005530086>

ภาพที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของ a) Branched-PEI (ภาพบน) และ b) Linear-PEI (ภาพล่าง)
(109)

2.17.1 ประโยชน์ของ Polyethylenimine (PEI) ในทางการแพทย์ (109, 110)

เนื่องจาก PEI เป็น polymer ที่มีประจุเป็นบวกจึงถูกนำมาใช้เคลือบบนผิว plate สำหรับเลี้ยง cell ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการเกาะติดของ cell ที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพราะผนัง cell ของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่มีประจุเป็นลบ จึงดึงดูดให้เกาะติดกับ plate ที่เคลือบด้วย PEI ที่เป็นประจุบวกได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม PEI เป็นสารที่เป็นพิษต่อ cell จึงต้องใช้อย่างระมัดระวังในปริมาณพอเหมาะ

PEI ยังเป็น polymer อีกชนิดนอกจาก poly-L-lysine ที่สามารถใช้เป็น transfection agent โดยนำเอา PEI มาติดไว้กับ DNA เพื่อให้มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกและไม่ทำให้ DNA เสียสภาพ

จากนั้น DNA จะเข้าสู่ cell ผ่านผนัง cell ที่เป็นประจุลบโดยวิธี endocytosis มักใช้ใน gene delivery(111, 112) นอกจากนั้น PEI ยังถูกนำมาใช้ในการปรับประจุบน solid support เพื่อการตรึงโปรตีน บนพื้นผิวแบบต่างๆ เช่น glass, metal และ plastic เช่น polystyrene, polycarbonate, polyvinyl chloride, polyethylene, polypropylene, silicone และ resins เป็นต้น เพราะช่วยลด non specific adsorption จากโมเลกุลอื่นๆที่ไม่ใช่โปรตีนเนื่องจากคุณสมบัติที่

เป็นประจุบวกบนผิว solid support จะดึงดูดสารละลายโปรตีนที่มีประจุลบให้เข้ามาใกล้และเพิ่มแรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุให้มากขึ้นตามความแตกต่างระหว่างประจุของสารนั้นๆ

Carboxylate-modified latex เป็น particles ที่มีหมู่ carboxyl บนผิว latex จึงมีคุณสมบัติเป็นประจุลบทำให้เกิดแรงผลักร่วมกับสารละลายโปรตีนที่ส่วนใหญ่ที่เป็นประจุลบเช่นกัน การนำ PEI มาเคลือบบนผิว Carboxylate-modified latex ก่อนนำโปรตีนมาตรึงจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกาะติดของโปรตีนได้มากยิ่งขึ้น มักใช้ในการตรึง beads แบบ covalent ซึ่งอาจมี coupling agent เช่น สารพวก carbodiimide ร่วมในขั้นตอนการตรึงด้วยด้วย เพื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรงของพันธะระหว่างหมู่ carboxyl บนผิว latex กับ amino groups ใน PEI (108)

2.18 การตรวจวัดเชิงแสง (optical detection) (113)

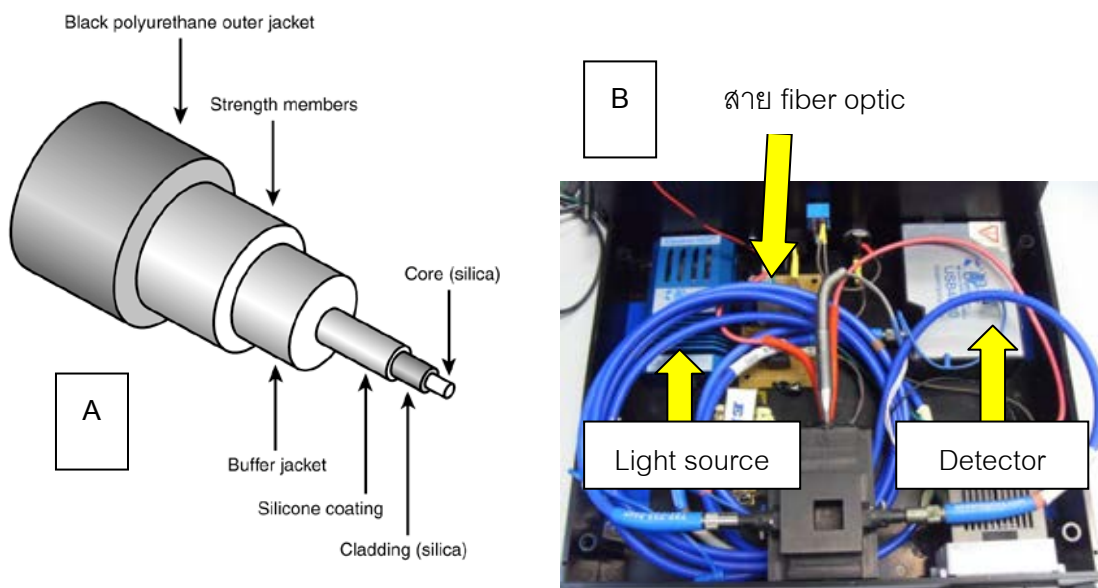
การตรวจวัดเชิงแสงเป็นการตรวจวิเคราะห์หาชนิดหรือปริมาณสารชีวภาพต่างๆโดยใช้หลักการดูดกลืนแสง, กระเจิงแสง และวาวแสง เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเฉพาะของสารชีวภาพโดยส่วนใหญ่สามารถดูดกลืนแสงหรือรังสีที่อยู่ในช่วงยูวี (10-400 nm) และช่วงความยาวคลื่นที่มองเห็นได้ (400-700 nm) หลักการคือแหล่งกำเนิดแสงจะปล่อยรังสีหรือแสงออกไปที่โมเลกุลของสารตัวอย่าง ทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่มีความยาวคลื่นต่างๆ ค่าการดูดกลืนแสงหรือค่า absorbance ของสารจะแปรผันกับขนาดและจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสงซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีของ Beer-Lambert ดังนั้นจึงสามารถระบุชนิดและปริมาณของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ การตรวจวิเคราะห์สารด้วยวิธีดังกล่าวจึงสามารถรายงานผลได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ด้วยเหตุนี้การตรวจวิเคราะห์สารโดยเทคนิคการตรวจวัดเชิงแสงจึงเป็นที่นิยมอย่างมากในงานด้านสิ่งแวดล้อม, อุตสาหกรรม, อาหารและด้านการแพทย์ เนื่องจากใช้งานง่าย มีความถูกต้องแม่นยำ และความไวสูง เครื่องตรวจวิเคราะห์ทั่วไปที่ใช้หลักการเชิงแสง เช่น spectrophotometer และ photometer

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือเหล่านี้ให้มีขนาดเล็กลง แต่สามารถตรวจวัดได้รวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น คือนำ fiber optic มาเชื่อมต่อกับแหล่งกำเนิดแสง (light source) และระบบตรวจจับสัญญาณ (detector) ที่มีหลักการเหมือนเครื่อง spectrophotometer ทั่วไป (ภาพที่ 2.11B) สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-1100 nm ควบคู่กับการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการควบคุมและแปลผลแบบ real time ทำให้ช่วยลดข้อจำกัดต่างๆของ

เครื่องมือขนาดใหญ่ได้ เช่น ลดการใช้พื้นที่, ลดการรบกวนจากคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic interference) และลดการสูญหายของสัญญาณระหว่างทาง

2.19 หลักการของ fiber optic sensor

เส้นใยนำแสง (fiber optic) คือสายนำสัญญาณที่มีโครงสร้างเป็นทรงกระบอกกลม โปร่งแสง ผลิตจากสารประกอบซิลิกอนไดออกไซด์ (SiO_2) หรือพลาสติกอื่นๆ มีขนาดเล็กระดับไมครอนหลายๆเส้นวางรวมกันอยู่ตรงกลาง (core) และถูกห่อหุ้มด้วยเส้นใยอีกชนิดหนึ่ง (cladding) ชั้นนอกสุดประกอบด้วยฉนวน (jacket) ทำหน้าที่ป้องกันแสงจากภายนอกไม่ให้เข้ามาในสาย fiber optic และเพิ่มความแข็งแรงให้กับ core และ cladding ทำจากวัสดุที่แตกต่างกันตามการใช้งาน (ภาพที่ 2.11A) ซึ่งในส่วนของ core จะมีค่าดัชนีหักเหของแสง (index of refraction) มากกว่าส่วนของ cladding เมื่อแสงผ่านไปตาม fiber optic จะเกิดการสะท้อนกลับหมด (total internal refraction) ทำให้การนำสัญญาณแสงจากจุดหนึ่งไปอีกจุดหนึ่งมีการสูญเสียพลังงานไปกับสิ่งแวดล้อมน้อยมาก ข้อจำกัดคือเมื่อสายใยแก้วขาดหักงอหรือแตกหักต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษในการซ่อมแซมซึ่งยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงมาก และควรระวังไม่ให้ฝุ่นละอองเข้าไปจับบริเวณปลายสายนำสัญญาณทำให้รบกวนการตรวจวัดได้



<http://www.brainbell.com/tutorials/Networkina/Fiber-optic Cable.html>

ภาพที่ 2.11 แสดงโครงสร้างของสาย fiber optic (A) และ การนำ fiber optic ไปใช้งานโดยเชื่อมต่อกับแหล่งกำเนิดแสงและระบบตรวจจับสัญญาณซึ่งระบบการตรวจวัดจะเหมือนกับเครื่อง spectrophotometer โดยทั่วไป แต่มีขนาดของเครื่องมือเล็กลงเนื่องจากสาย fiber optic มีความยืดหยุ่นสามารถขดกันเพื่อลดพื้นที่ได้ (B)

การแบ่งประเภทของ fiber optic ตามการเดินทางของแสงได้ 2 ชนิดคือ

1. Single-Mode Fiber มีแนวของลำแสงอยู่ในแนวเดียว เรียกว่า Single Mode Fiber Optic (SMF) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ core ประมาณ 5-10 ไมครอน และ Cladding 125 ไมครอน ลำแสงจะพุ่งตรงไปตามท่อแก้ว โดยมีการกระจายแสงออกทางด้านข้างน้อยที่สุดเหมาะสำหรับการส่งสัญญาณในระยะไกล

2. Multi-Mode Fiber มีแนวของลำแสงอยู่เป็นจำนวนมาก เรียกว่า Multi-Mode Fiber Optic (MMF) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ core ประมาณ 50 - 62.5 ไมครอนและ Cladding 125 ไมครอน การใช้งานของ Multi-Mode เป็นไปอย่างแพร่หลายและจะถูกเลือกใช้แทนสาย Single mode ในการส่งสัญญาณในระยะทางไม่ไกลมาก

แหล่งกำเนิดแสง (light source) มีหน้าที่ปล่อยความเข้มของแสงอย่างคงที่และต่อเนื่องเข้าสู่สาย fiber optic สำหรับสารที่ดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตจะใช้หลอดดีทิวเทอเรียม

(deuterium lamp) เป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 185-375 nm หลักการคือทำให้อะตอมดีวเทอเรียมที่อยู่ในสภาวะเร้าคายพลังงานออกมา ส่วนหลอดทังสแตน (tungsten filament lamp) จะให้แสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นได้ คือตั้งแต่ 320-2500 nm หลักการจะคล้ายกับหลอดไฟทังสแตนทั่วไปคือ ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปจนกระทั่งหลอดทังสแตนร้อนและเปล่งรังสีออกมาระบบตรวจจับสัญญาณ (detector) เชื่อมต่อกับปลายสายอีกด้านของ fiber optic เพื่อรับสัญญาณที่เกิดขึ้น ปัจจุบันนิยมใช้ 2 ชนิดคือโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube; PMT) และโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (photodiode arrays; PDA) เนื่องจากวัดสัญญาณครอบคลุมช่วงความยาวคลื่นกว้างตั้งแต่ 200-1100 nm การทำงานของ PMT ประกอบไปด้วยแคโทด (cathode) ที่ฉาบผิวด้วยสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ เมื่อแสงตกกระทบกับแคโทดจะปล่อยอิเล็กตรอนออกมามากขึ้นเรื่อยๆ เป็นการเพิ่มกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เครื่องตรวจจับเพื่อขยายสัญญาณที่เกิดขึ้นต่อไป การรายงานค่าสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นแบบ analog-to-digital (A/D) ที่มีความสะดวกและง่ายในการแปลผลมากยิ่งขึ้น ตัวตรวจจับสัญญาณแบบโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ประกอบไปด้วยโฟโตไดโอดและตัวเก็บประจุ (capacitor) โดยให้ประจุผ่านผิวหน้าไดโอด ซึ่งไดโอดก็จะเก็บประจุไว้ที่ตัวเก็บประจุ เมื่อแสงตกลงบนไดโอดจะทำให้เกิดประจุไฟฟ้าไปทำลายประจุที่เก็บไว้ที่ตัวเก็บประจุ ทำให้ต้องใส่ประจุเพิ่มเข้าไปใหม่ซึ่งปริมาณของประจุที่ต้องใส่เข้าไปใหม่ จะเป็นปริมาณโดยตรงกับความเข้มแสงที่วัดได้ของแต่ละไดโอด ดังนั้นจากการวัดปริมาณแสงที่แตกต่างกันตลอดช่วงความยาวคลื่นจะได้เป็นสเปกตรัมการดูดกลืนของสารนั้นออกมา ตัวตรวจจับสัญญาณชนิดนี้มีความไวน้อยกว่า PMT

2.20 การวัดการดูดกลืนแสง (absorption detection)

การวัดการดูดกลืนแสง (absorption detection) สามารถวัดได้ในรูปของ

1. ความเข้มของการดูดกลืน (intensity of absorption) เช่น วัดความส่องผ่าน (transmittance), วัดค่าการดูดกลืน (absorbance) และ วัดค่าคงที่ของการดูดกลืนของสารละลาย (molar absorptivity)
2. พลังงานของการดูดกลืน (energy of absorption) เช่น ความถี่ (frequency), เลขคลื่น (wavenumber) ความยาวคลื่น (wavelength)

2.20.1 กฎการดูดกลืนแสงเบียร์แลมเบิร์ต (Beer - Lambert Law or Law of Light Absorption)

เมื่อปล่อยรังสีที่เป็นรังสีชนิดลำแสงขนาน (parallel beam) ที่ความยาวคลื่นเดียว (monochromatic radiation) ให้ผ่านตัวอย่างที่เป็นสารละลายเนื้อเดียว (homogeneous solution) ค่า absorbance จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของตัวอย่าง (concentration) และ ระยะทางที่แสงส่องผ่านตัวอย่าง (pathlength) ค่า absorbance ของตัวอย่างสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

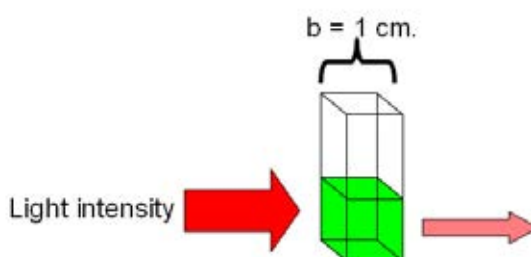
$$A = abc$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร (absorbance)

a = ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงของสารละลาย (absorptivity coefficient) ซึ่งเป็นค่าจำเพาะแตกต่างกันตามลักษณะของสารที่นำมาวัดและความยาวคลื่นที่เปลี่ยนไป

b = ระยะทางที่แสงส่องผ่านตัวอย่างหรือความกว้างของเซลล์ (pathlength) หน่วยเป็นเซนติเมตร

c = ความเข้มข้นของสารละลาย (concentration)



ภาพที่ 2.12 แสดงการดูดกลืนแสงของสารละลายระยะทาง 1 cm. เมื่อปล่อยให้แสงผ่านไปยังสารละลายจะถูกดูดกลืนแสงบางส่วนไว้ ทำให้แสงที่ผ่านออกมามีความเข้มแสงลดลง

เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของสารมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต ดังนั้นเมื่อนำเอาความเข้มข้นของสารมา plot ในแกน x และนำค่าการดูดกลืนแสงมา plot ในแกน y จะได้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงหรือ standard curve เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ไม่ทราบความเข้มข้นไปเทียบกับ standard curve หรือคำนวณจากสมการเชิงเส้นตรงของ standard curve จะทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของสารชนิดนั้นได้

2.21 การนำ fiber optic sensor ไปใช้ประโยชน์

การนำเทคนิคการตรวจวัดสารชีวภาพต่างๆโดยใช้ fiber optic sensors ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะด้านวิทยาศาสตร์ เช่น การตรวจหาสารเคมีในทางอุตสาหกรรม, สารพิษในสิ่งแวดล้อม, สารชีวเคมีในร่างกายนอกเหนือจากนั้นยังมีการพัฒนาเพื่อการตรวจวัดในด้าน non-chemical เช่น การตรวจวัดอุณหภูมิ (114), แก๊ส (115) และความชื้น (116) เป็นต้น เนื่องจาก fiber optic มีคุณสมบัติเหมือนกับ optical spectroscopy ให้สัญญาณการตรวจวัดที่ดี มีความไวสูง แต่มีขนาดเล็กกระทัดรัดจึงสามารถนำไปใช้งานนอกสถานที่หรือในจุดห่างไกลที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการใช้งานด้วยเครื่องมือที่มีขนาดใหญ่ มีราคาถูก fiber optic sensors ยังมีหลายชนิดสามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสมกับประเภทของการทำงาน (117)

การประยุกต์ใช้ fiber optic sensors ทางด้านการแพทย์

1. **Enzymatic biosensors** ได้แก่ การนำปฏิกิริยาทางเอนไซม์มาใช้ในการตรวจวัด เช่น การตรวจระดับกลูโคสในเลือดโดยใช้ glucose oxidase และ peroxidase (118) , การศึกษาด้านการดื้อยาโดยใช้เอนไซม์ β -lactamases ในยีสต์เซลล์ (119), การตรวจหายาฆ่าแมลงโดยใช้เอนไซม์ organophosphate hydrolase (120), การตรวจหาเอนไซม์ galactosidase (121) เป็นต้น

2. **Immunosensors** ได้แก่ การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณ antinuclear antibodies ในเลือดโดยใช้ colloidal gold ทดแทนวิธี ELISA(122), การหาแอนติบอดีต่อ F1 antigen ของเชื้อ Yersinia pestis ก่อโรคติดต่อกัด (123) , การหา autoantibody ต่อโรคมะเร็งรังไข่และเต้านมที่มีความไวสูงโดยใช้หลักการ chemiluminescence และ optical fiber immunosensor (124), การหา aflatoxin B1 และ ochratoxin A โดยใช้หลักการ competitive immunoassay (125)

3. **DNA biosensors** ได้แก่ การนำ fiber optic ร่วมกับ DNA microarray เพื่อศึกษาชนิดของสารร้ายทะเล (126), การวัดปริมาณ viral DNA ในโรคไวรัสตับอักเสบบี (127)

4. **Bacterial biosensors** ได้แก่ การตรวจหาสารพิษตกค้าง mercury และ arsenic ในดินโดยใช้หลักการ recombinant luminescent bacteria (128) , การตรวจหาปริมาณ biochemical oxygen demand (BOD) ในน้ำทะเล โดยใช้แบคทีเรียมาตรึงบนผิว ormosil matrix แล้ววัดการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ fluorescent optical fiber sensors (129)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรที่ใช้ในงานวิจัย

การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ : ปัสสาวะเหลือจากผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 126 คน

การทดลองในระดับภาคสนาม : ปัสสาวะจากอาสาสมัครโรคเบาหวานจำนวน 120 คน จาก

- โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลเขาขลุง อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี จำนวน 18 ราย
- โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลท่าผา อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี จำนวน 31 ราย
- โรงพยาบาลสมเด็จพระสังฆราชองค์ที่ 17 อ.สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี จำนวน 71

ราย

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	Analytical Balance รุ่น AG245	Mettler Toledo, USA
2	Autoclave model รุ่น TOMY SX-500	Tomy, California
3	Bransonic bench-top ultrasonic cleaners model 2510	Branson, Canada
4	Centrifuge รุ่น MIKRO 200	Hettich zentrifugen, USA
5	Hot air oven	Memmert, Germany
6	Hotplate stirrer	IKA® CMAG HS7, USA
7	Microplate reader	Perkin Elmer, Finland
8	Miniature fiber optic spectrometer (USB4000) with LS-1-LL tungsten light source	Ocean Optics Inc., USA
9	OMNIDRIVER a multi-platform software	Ocean Optics Inc., USA
10	Optical Fibers	Ocean Optics Inc., USA
11	pH meter รุ่น ORION 2 STAR	Thermo Scientific, USA
12	SPECTRASUITE operating software	Ocean Optics Inc., USA
13	Temperature controller (TPS 1500w) PELTIER CRYOBATH SYSTEM	Thermo Fisher science, USA
14	Temperature controller in portable system	Local made, Thailand
15	Transmission Electron Microscope (TEM) รุ่น JEM-2100	JEOL, Japan
16	Ultrapure water system (Miili Q)	Millipore, USA
17	Vortex Mixer	FINEPCR, Korea
18	UV-VIS spectrophotometer (Evolution 600)	Thermo Scientific, USA

3.3 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	0.45 micron membrane filter	Pall Corporation, USA
2	96 well ELISA plate	Nunc, Denmark
3	Auto pipette (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)	Gilson, Inc., USA
4	Duran bottles	SCHOTT, Germany
5	Microcentrifuge tube 1.5 ml, 2.0 ml	Axygen® Scientific, USA
6	Pipette tip (10 μ L, 200 μ L ,1000 μ L)	Gilson, Inc., USA
7	Plastic syringes 10 mL	NIPRO, Thailand
8	Polystyrene cuvette (1cm-path length)	Sterilin, Barloworld Scientific Ltd, UK
9	Quartz cuvette (1cm-path length)	Starna Scientific Ltd, UK
10	Urine centrifuge tube 15 ml, 50 ml	Corning Incorporated, USA
11	Volumetric glassware (beaker, volumetric flask)	PYRAX, USA
12	Volumetric pipette (1 mL, 5 mL, 10 mL)	HBG, Germany

3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นชนิด analytical grade ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	Ampicillin	Fluka, Buchs, Switzerland
2	Bilirubin	Fluka, Buchs, Switzerland
3	Bovine serum albumin (A4503)	Sigma Aldrich, USA
4	Branched polyethyleneimine (BPEI) (408727)	Sigma Aldrich, USA
5	COOH/PAA 0.51 μ m latex microspheres	Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN
6	Creatinine (C4255)	Sigma Aldrich, USA
7	D-(+)-glucose (G5767)	Sigma Aldrich, USA
8	Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	Merck, Germany
9	Gamma globulin (G4386)	Sigma Aldrich, USA
10	Hemoglobin (H7379)	Sigma Aldrich, USA
11	Hydrochloric acid 37 %(HCl)	Merck, Germany
12	Human serum albumin (A1653)	Sigma Aldrich, USA
13	KCL (Potassium chloride)	Merck, Germany
14	L-Ascorbic acid (vitamin C)	POCH SA, Gilwice, Poland
15	Microalbumin liquid controls	Randox Laboratories LTD, UK
16	Microalbuminuria assay kit	BioSystems (Barcelona, Spain)
17	Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000)	Fluka, Buchs, Switzerland

ลำดับ	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
18	Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck, Germany
19	Protein assay reagent (Comassie Brilliant Blue G-25 dye)	Bio-Rad Laboratories, USA
20	Rabbit anti-human albumin antibody (A3293)	Sigma Aldrich, USA
21	Randox mALB kit and calibrator	Randox Laboratories LTD, UK
22	Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
23	Sodium hydroxide	Merck, Germany
24	Tris(hydroxymethyl aminomethane)	USB [®] , Cleveland OH, USA
25	Tween-20	Fluka, Buchs, Switzerland
26	Urea	Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden
27	Uric acid (U2625)	Sigma Aldrich, USA

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 การตรึง Human serum albumin (HSA) บน carboxylated polystyrene beads

ในงานวิจัยนี้ใช้ polystyrene beads ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ชนิด P(S/15%AA) high acid content มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $0.51 \mu\text{m}$ พื้นผิวของ beads เป็นหมู่ COOH (Carboxyl group) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นประจุลบ มาทำการปรับปรุงผิวให้มีประจุบวกก่อนนำไปตรึงกับอัลบูมิน โดยงานวิจัยนี้ใช้ Branched polyethyleneimine (BPEI) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ประจุบวก (cationic polymer) วิธีการตรึง นำสารละลาย beads (4 mg) ปริมาตร $40 \mu\text{L}$ มาผสมกับ 0.005 mg/mL BPEI ที่ละลายใน 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 ปริมาตร $360 \mu\text{L}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 9300 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูตัวอย่างที่ปั่นแล้ว จะได้ beads suspension ที่มีประจุบวกบนพื้นผิว จากนั้นนำไปผสมกับ human serum albumin ที่มีความเข้มข้น $548 \mu\text{g/mL}$ (ละลายใน 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) ปริมาตร $400 \mu\text{L}$ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 9300 rpm เป็นเวลา 10 นาที และแยกส่วนใสเก็บไว้เพื่อวัดปริมาณโปรตีนหลังตรึงอัลบูมิน ขั้นตอนดังกล่าวมาเป็นการตรึง human serum albumin ให้เกาะติดบนผิว beads เนื่องจาก human serum albumin มีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.7 ดังนั้นเมื่อนำมาละลายใน buffer ที่มี pH 7.4 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า pI ก็จะทำให้มีประจุสุทธิเป็นประจุลบ (anion) จึงเกิดการดึงดูดให้ human serum albumin เคลื่อนที่เข้าไปใกล้ผิว beads ที่มี BPEI เคลือบอยู่ และตรึงบนผิวของ beads จากนั้นจะทำการปิดทับ (blocking) พื้นผิว beads ที่อาจหลงเหลือจากการตรึง human serum albumin โดย blocking buffer คือ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 ที่มีส่วนผสมของ 1% BSA และ 0.05% Tween-20 เติมนลงใน immobilized beads suspension ปริมาตร $400 \mu\text{L}$ และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันต่ออีก 30 นาที จากนั้นนำสารละลาย beads ไปปั่นแยกส่วนใสทิ้ง แล้วเติม storage buffer ปริมาตร $400 \mu\text{L}$ ซึ่งในงานวิจัยนี้คือ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 ที่มีส่วนผสมของ 1% BSA และ 0.05% Tween-20 ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วเก็บเป็น stock beads solution ไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้งาน ส่วนใสที่แยกไว้ในขั้นตอนก่อนตรึงและหลังตรึงโปรตีนบน beads นำมาหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Bradford protein assay (130) เพื่อคำนวณหาประสิทธิภาพของการตรึงโปรตีน (%yield)

ก่อนนำ immobilized beads ไปใช้งานในแต่ละครั้งต้องนำ stock beads solution มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 นาทีและผสมกลับไปมาเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นเจือ

จาก beads ในอัตราส่วน 1:10 ด้วย 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 เพื่อใช้เป็น working beads solution โดยค่า OD 510 nm ของ working bead solution อยู่ประมาณ 0.8-0.9 สำหรับการตรึงแต่ละครั้ง เมื่อเริ่มต้นจากสารละลาย beads ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 mg/mL (10% solid beads) และใช้ปริมาตร 40 μ L (4 mg) จะสามารถเตรียม stock beads ได้ 400 μ L เมื่อนำมาเตรียมเป็น working beads จะได้ปริมาตร 4000 μ L ตรวจวัดได้ทั้งหมด 80 ครั้ง

3.5.2 วิธีการตรวจวัดปริมาณโปรตีนก่อนและหลังตรึงโดยวิธี Bradford protein assay (130)

Bradford protein assay เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้หลักการ dye-binding ในสภาวะความเป็นกรด Coomassie Brilliant Blue G-250 dye ในสภาวะที่ไม่ได้จับกับโปรตีน มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 465 nm แต่เมื่อสีจับกับโปรตีน ทำให้ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดเพิ่มขึ้น เป็นที่ 595 nm และค่าการดูดกลืนแสงจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นโปรตีนที่ ตรวจวัดได้ด้วย spectrophotometer หรือ microplate reader

ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำยา Bio-Rad Protein Assay ของบริษัท Biorad โดยเจือจาง bovine serum albumin standard ให้มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL ด้วย 0.9% normal saline จากนั้นเตรียม working Bradford reagent โดยผสมน้ำยา Coomassie Brilliant Blue G-250 dye ในอัตราส่วน 1 ต่อ deionized water 4 ส่วน จากนั้นเติม bovine serum albumin standard หรือ สารตัวอย่างลงใน microcentrifuge tube หลอดละ 10 μ L เติม working Bradford reagent ลงไป 500 μ L ผสมให้เข้ากันดีด้วย Vortex mixer แล้ววางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยใช้ 96 well microplate แต่ละหลุมใช้ปริมาตร 200 μ L อ่านการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader โดยแต่ละสิ่งตัวอย่างทำปฏิกิริยาจำนวน 2 หลุม (duplicates) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm กับความเข้มข้นของ bovine serum albumin standard จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณโปรตีนก่อนและหลังตรึง beads ต่อไป

3.5.3 การทดสอบลักษณะทางกายภาพของ beads ก่อนตรึงและหลังตรึง human serum albumin โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM)

เนื่องจาก beads ที่นำมาตรึงโปรตีนมีขนาดเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร ในงานวิจัยนี้มีขนาด 510 ไมโครเมตร ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของสารตัวอย่างได้อย่างชัดเจน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ Bright field ซึ่งใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ เนื่องจากมีกำลังขยายเพียง 10-100 เท่า ดังนั้นเพื่อป้องกันข้อผิดพลาด ขนาด ลักษณะความแตกต่างระหว่าง beads ก่อนตรึงและหลังตรึงโปรตีน จึงทำการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน หรือ Transmission Electron Microscopy (TEM) คุณสมบัติของกล้อง TEM คือสามารถถ่ายภาพวัตถุที่มีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตร โดยมีกำลังขยายสูงสุด 5 แสนถึง 1 ล้าน 5 แสนเท่า ทำให้บอกถึงลักษณะรูปร่างและขนาดของวัตถุได้อย่างชัดเจน กล้อง TEM ถูกนำมาใช้วิเคราะห์งานด้านวิทยาศาสตร์กันอย่างกว้างขวาง เช่น งานวิจัยด้านมะเร็ง (131), ไวรัส (132), วัสดุศาสตร์และโพลิเมอร์ (133) และนาโนเทคโนโลยี (134, 135) เป็นต้น

หลักการของกล้อง TEM (136) คือ electron gun จะปล่อย electron พร้อมกระแสไฟฟ้าแรงสูงเพื่อช่วยให้ electron มีพลังงานสูงขึ้นพอที่จะทะลุผ่านตัวอย่าง แต่ก่อนที่ electron จะเคลื่อนที่มากระทบตัวอย่าง electron จะถูกยิงผ่านเลนส์จำนวน 2 ชุด ได้แก่ condenser lens และ objective lens ทำให้เกิดการเลี้ยวเบนของ electron และจะปรากฏเป็นจุดตัดของ electron ซึ่งอยู่ด้านหลังของ objective lens เรียกว่า back focal plane ซึ่งเป็นบริเวณที่กำหนดชนิดของภาพที่จะปรากฏบน fluorescence screen โดยขึ้นอยู่กับ objective aperture และภาพดังกล่าวจะถูกขยายต่อโดย intermediate lens และ projector lens ภาพที่ปรากฏบริเวณสี่ดำเกิดจาก electron ที่เลี้ยวเบนแล้วถูกบังโดย aperture เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีค่า atomic number หรือความหนาแน่นสูงกว่าบริเวณที่เป็นสีขาว ภาพที่ได้จากการวิเคราะห์จะถูกบันทึกเป็นไฟล์อิเล็กทรอนิกส์โดย CCD cameras ความละเอียด 2K X 2K สำหรับการวัดขนาดของวัตถุจะวัดเทียบกับ scale bar ที่อยู่ด้านล่างของภาพ



ภาพที่ 3.1 ลักษณะภายนอกของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) รุ่น JEM-2100 (200KV) ผลิตโดยบริษัท JEOL, Japan

ก่อนนำ beads ไปทดสอบลักษณะทางกายภาพด้วยกล้อง TEM นั้นจะต้องมีการเตรียม beads โดยการอ้อม Osmium tetroxide (OsO_4) โดยนักวิทยาศาสตร์ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประโยชน์ของ OsO_4 ใช้ในขั้นตอนการ staining และ fixation โดยจะทำปฏิกิริยากับชั้นของโปรตีน เพื่อรักษาโครงสร้างของตัวอย่างไม่ให้ถูกทำลายและทำให้เห็นความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพเมื่อส่องกล้องชัดเจนมากขึ้น วิธีทำโดยย่อดังนี้ การเตรียมตัวอย่างเพื่ออ้อม OsO_4 ต้องทำในตู้ดูดควันด้วยความระมัดระวัง โดยเตรียม OsO_4 ละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 2-4% หยดลงบนสำลี แล้ววางด้านข้างใน petri dish ที่มี formvar grid ที่ผ่านการหยดตัวอย่างแล้วอยู่ตรงกลางรีบปิดฝาครอบ petri dish วางตั้งไว้ในตู้ดูด

คว้น 24 ชั่วโมงจนแห้งสนิท จากนั้นนำ grid ที่ย้อมแล้วมาตรวจวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านต่อไป

3.5.4 วิธีการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการ PETINIA

3.5.4.1 การตรวจด้วยเครื่อง Laboratory spectrophotometer

ในเบื้องต้น ระหว่างขั้นตอนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา ได้ทำการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Evolution 600) บันทึกอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม VISIONlite (rate) ซึ่งเป็น software ที่ผู้แทนจำหน่ายติดตั้งมาพร้อมกับเครื่องมือ อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาควบคุมให้คงที่ที่ 37 °C และติดตามอัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm โดยใช้ assay buffer ตั้งค่าศูนย์ ช่วงเวลาในการตรวจวัด 2 นาที

ถ้าไม่กล่าวเป็นอย่างอื่น ขั้นตอนการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในงานวิจัยนี้เป็นดังนี้ เติมตัวอย่างปัสสาวะหรืออัลบูมินมาตรฐานปริมาตร 12 μL ผสมกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมิน (polyclonal human albumin) ที่มีความเข้มข้น 13 μg (ในการทดลองนี้ใช้ปริมาตร 50 μL) ลงไปใน cuvette ที่มี assay buffer (40 mM potassium phosphate buffer pH 7.4, 400 mM NaCl, 8% PEG) ปริมาตร 250 μL และเติมน้ำกลั่นเพื่อให้ปริมาตรครบ 450 μL ผสมให้เข้ากันเบาๆ ระวังอย่าให้มีฟอง แล้วอยู่ที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม working beads solution ปริมาตร 50 μL ผสมกลับไปมาเบาๆ อีกครั้ง จากนั้นนำไปอ่านการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ 510 nm เป็นเวลา 2 นาที (ดังแสดงในตารางที่ 3.4) ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสง (dA/min) และ human serum albumin standards ความเข้มข้นต่างๆ (0, 18.75, 37.5, 75, 150, 200 และ 300 mg/L) สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน สำหรับหาค่าความเข้มข้นของไมโครอัลบูมินในปัสสาวะจากสิ่งตัวอย่างต่อไป โดยแต่ละสิ่งตัวอย่างได้ทำการตรวจซ้ำสองครั้ง (duplicates) และมีการควบคุมคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Control Urine ที่ทราบช่วงความเข้มข้นทั้งสองระดับทำการตรวจวัดควบคู่ไปด้วยเสมอ

ตารางที่ 3.4 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ

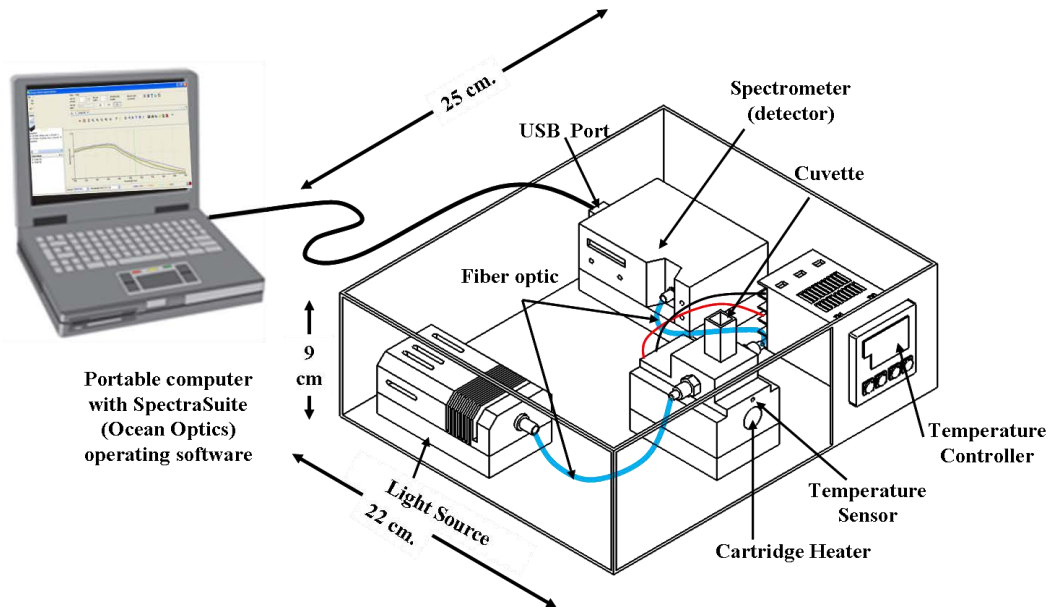
Reagents and samples	Volume	Final concentration Per reaction 500 μ L
Reagent buffer	250 μ L	20 mM Potassium phosphate buffer, pH 7.4, 200 mM NaCl, 4% PEG
Sample (HSA std, urine sample, controls)	12 μ L	
Antibody (260 μ g/mL)	50 μ L	13 μ g
DW	138 μ L	
Mixed well and incubated at 37 °C 2 min		
Working Beads solution (1 mg/mL)	50 μ L	0.05 mg beads
Mixed well and recorded at 510 nm for 2 min, at 37 °C Calculated the $\Delta A/\text{min}$		

3.5.5 การติดตั้งระบบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเพื่อใช้ใน

ภาคสนาม

ระบบการตรวจวัดไมโครอัลบูมินเพื่อใช้ในภาคสนามเป็นการย่อส่วนเครื่องมือตรวจวัดเชิงแสงที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น spectrophotometer เป็นเครื่อง miniature fiber optic spectrophotometer ซึ่งประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสง (light source) และส่วนที่ใช้ตรวจจับสัญญาณที่เกิดขึ้น (USB4000 spectrometer) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรม SpectroCU_V3 พัฒนาโดยคณะผู้วิจัย ปฏิบัติการตรวจวัดเกิดขึ้นใน cuvette ซึ่งวางใน cuvette holder ที่ถูกเชื่อมต่อกับ light source และ spectrometer บริเวณ cuvette holder จะถูกควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลองโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่พัฒนาขึ้นเองในกลุ่มคณะผู้วิจัย อุปกรณ์ทั้งหมดถูกจัดวางอย่างเป็นระบบในกล่องขนาดเล็กขนาด 22 x 25 x 9 cm ดังแสดงในภาพที่ 3.2 และ 3.3 ระบบดังกล่าวมีน้ำหนักทั้งสิ้น 2088 กรัม โดยได้ออกแบบให้มีพดล

และต้องระบายความร้อนจากแหล่งกำเนิดแสงและหน้าต่างปิดแสงรบกวนในบริเวณที่ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยาการดูดกลืนแสง



ภาพที่ 3.2 แสดงองค์ประกอบภายในของระบบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเพื่อใช้ในภาคสนาม

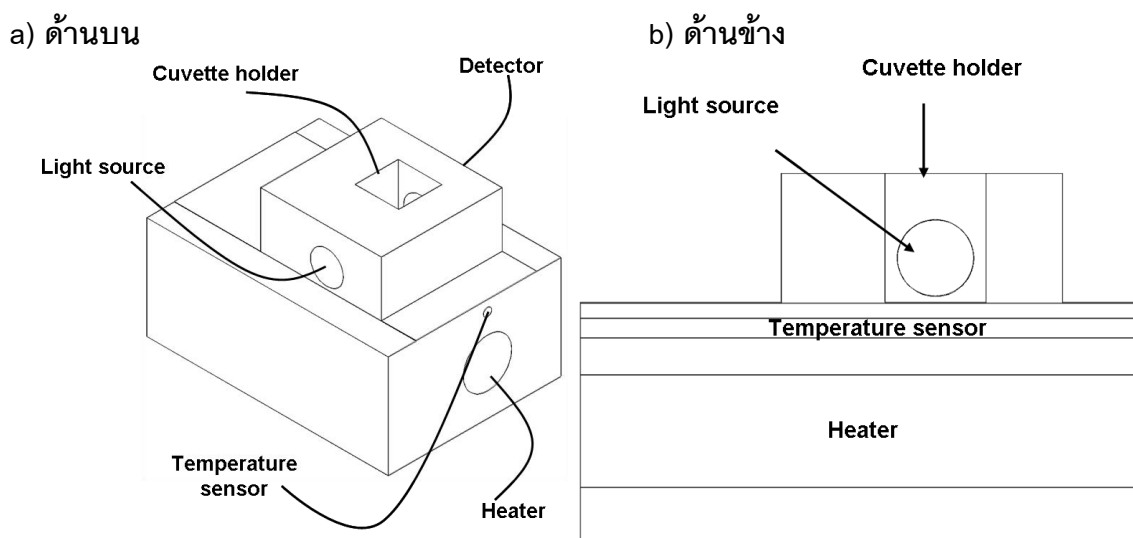


ภาพที่ 3.3 แสดงลักษณะภายนอกและช่องสำหรับใส่ตัวอย่างของเครื่องตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเพื่อใช้ในภาคสนาม

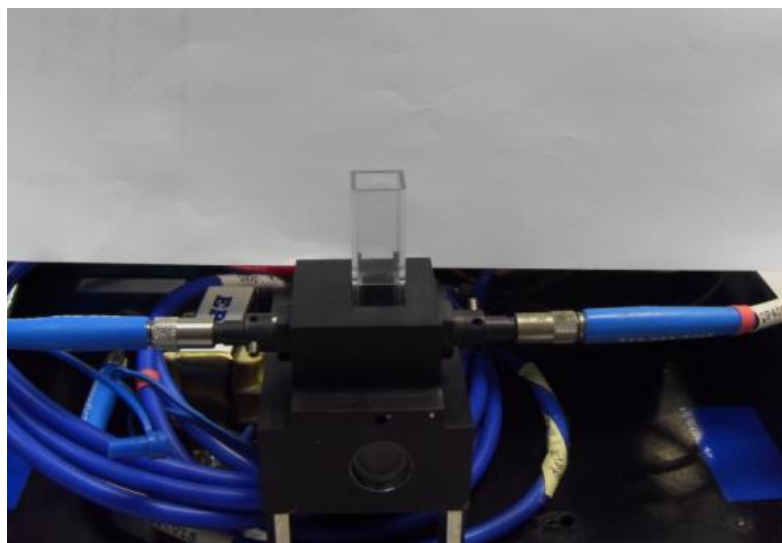
3.5.6 การติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller)

เครื่องควบคุมอุณหภูมินี้เป็นเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นเองโดยคณะผู้วิจัย และได้นำไปติดตั้งกับชุดของ fiber optic spectrometer สำหรับควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37°C เครื่องมือประกอบด้วย ตัวให้ความร้อนแบบแท่ง (cartridge heater), กล่องให้ความร้อนอลูมิเนียม (aluminium heating box) และตัววัดอุณหภูมิ (temperature sensor) ซึ่งควบคุมความร้อนโดย temperature controller ของบริษัท MISUMI โดยสามารถเลือกอุณหภูมิได้ตามต้องการและควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลอง มีค่าผิดพลาดประมาณ $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$

การติดตั้งส่วนประกอบสำหรับควบคุมอุณหภูมิ จะใช้แผ่นอลูมิเนียมเป็น heating box ซึ่งมีน้ำหนักเบาและไม่เป็นสนิม ประกอบกันให้มีช่องว่างตรงกลางขนาดพอดีกับ cuvette และเจาะรูด้านข้างทั้งสองด้านเป็นช่องเพื่อเชื่อมต่อกับ light source และ detector ผิวด้านนอกของ cuvette และแผ่นอลูมิเนียมจะสัมผัสกัน ซึ่งความร้อนจะถูกส่งผ่านจาก cartridge heater ด้านล่างไปยัง cuvette ที่วางอยู่ด้านบน ทำให้อุณหภูมิคงที่ตลอดการทดลอง แล้วทำการติดตั้งตัววัดอุณหภูมิ (temperature sensor) ให้อยู่ระหว่าง cartridge heater และ cuvette ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาทำให้ค่าอุณหภูมิที่วัดได้นั้นเป็นอุณหภูมิของวัตถุที่ต้องการให้ความร้อนโดยแท้จริง



ภาพที่ 3.4 ภาพมุมมอง a) ด้านบน b) ด้านข้าง ของเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ติดตั้งใน fiber optic spectrometer



ภาพที่ 3.5 แสดงบริเวณ cuvette holder ที่มีการติดตั้งเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเชื่อมต่อกับสายใยแก้วนำแสง

3.5.7 การหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ของน้ำยาและวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ

3.5.7.1 การทดสอบหาปริมาณ human serum albumin ที่เหมาะสมในการตรึง beads

การหาปริมาณโปรตีนที่ใช้ตรึงบน beads เป็นขั้นตอนสำคัญเพื่อใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทาง immunoassay เพราะการเรียงตัวที่ดีของโปรตีนบน beads จะทำให้เพิ่มโอกาสการจับกันระหว่าง antigen/antibody และลดการเกิด non-specific binding อีกด้วย โดยทั่วไปนิยมเติมโปรตีนให้มากกว่า monolayer ประมาณ 3-10 เท่า ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งานของ beads นั้นๆ เช่น ตรึง antigen หรือ antibody และ ใช้ในหลักการ agglutination หรือ immunoturbidity เป็นต้น (137)

Beads ที่ใช้ในการวิจัยนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $0.51 \mu\text{m}$ น้ำหนัก beads ที่ใช้ในการตรึงเริ่มต้นคือ 4 mg

โดยในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาถึงปริมาณของอัลบูมินสำหรับตรึงบนผิว beads ที่เคลือบด้วย BPEI แล้วตาม ความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้

- a). ใช้ human serum albumin ความเข้มข้น 0.137 mg/mL
- b). ใช้ human serum albumin ความเข้มข้น 0.548 mg/mL
- c). ใช้ human serum albumin ความเข้มข้น 1.096 mg/mL

จากนั้นนำ beads/BPEI ที่เตรียมไว้มาตรึงด้วย human serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันดังข้างต้นตามขั้นตอนการตรึง beads จากนั้นนำ immobilized beads มาทดสอบกับ human serum albumin standard ที่ความเข้มข้น 0, 75, 150 mg/L ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น แล้วเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาของ immobilized beads ทั้ง 3 แบบว่า beads/BPEI ที่ตรึงโปรตีนด้วยความเข้มข้นใดให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาดีที่สุดและให้ช่วงการตรวจวิเคราะห์ (linear range) กว้างที่สุด จึงเลือก beads ที่ตรึงโปรตีนด้วยความเข้มข้นนั้นมาทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.7.2 การทดสอบหาปริมาณ BPEI ที่เหมาะสมในการตรึง beads

ปริมาณ BPEI ที่ใช้ ควรมีปริมาณเพียงพอสำหรับตรึงและจับกับประจุลบของ carboxylated beads เพื่อไม่ให้มีประจุลบบน beads หลงเหลืออยู่ ซึ่งประจุลบทำให้เกิดการจับอย่างไม่จำเพาะ (non-specific binding) ได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงปริมาณ BPEI ที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึง ทดสอบโดยโดยเจือจาง BPEI ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันได้แก่ 1, 0.5, 0.05, 0.005, 0.001 mg/mL ผสมกับ beads จากนั้นนำทุกหลอด มาเติม human serum albumin ความเข้มข้น 0.548 mg/mL (เนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้น หัวข้อ 3.5.7.1 การใช้อัลบูมินความเข้มข้น 0.548 mg/mL ให้ผลดีที่สุด) เมื่อนำอัลบูมินมาตรึงบนผิวของ BPEI สังเกตการเกาะกลุ่มตกตะกอนของ beads reagents ภายในเวลา 1 ชั่วโมง

3.5.7.3 การทดสอบหาช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม

การตรวจวิเคราะห์สารต่างๆ โดยใช้เทคนิค light absorbance ต้องมีการกำหนดค่าความยาวคลื่นของการตรวจวัดให้ถูกต้อง เนื่องจากความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของสารต่างๆ ไม่เท่ากัน การทดสอบหาช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับติดตามปฏิกิริยา immunoagglutination ในงานวิจัยนี้ ทำโดยนำ human serum albumin standard ความเข้มข้น 37.5 mg/L มาทำปฏิกิริยา PETINIA ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น ตามหัวข้อที่ 3.5.4.1 ขณะเกิดปฏิกิริยาทำการ scan spectrum โดยใช้โปรแกรม VISIONlite (scan) โดยเลือกความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-700 nm เพื่อดูว่าผลของปฏิกิริยาการตรวจวัดมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วงความยาวคลื่น

โต และการดูดกลืนแสงควรเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป ความยาวคลื่นที่เหมาะสมควรมีความไวเหมาะสม และมีสัญญาณรบกวนการเกิดปฏิกิริยาน้อยที่สุด จึงเลือกใช้ความยาวคลื่นในช่วงนั้นมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.7.4 การทดสอบหาระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม

เนื่องจากหลักการ PETINIA ในงานวิจัยนี้ มีพื้นฐานจากปฏิกิริยา competitive immunoassay และติดตามการเกิดปฏิกิริยาแบบ kinetic ดังนั้นการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกจึงมีความสำคัญ นำไปสู่การรายงานผลที่ถูกต้อง รวดเร็ว ทำการทดสอบโดยใช้ human serum albumin standard ความเข้มข้น 0, 37.5, 75 และ 150 mg/L ทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.5.4.1 โดยทั้งระยะเวลาการ incubate สารระหว่าง human serum albumin standard กับแอนติบอดีในขั้นตอนแรกเป็นเวลา 0, 1, 2, 5, 10, 20 นาที ก่อนเติม immobilized beads ลงไปแย่งจับและบันทึกอัตราการดูดกลืนแสงเป็นระยะเวลา 2 นาทีหลังเกิดปฏิกิริยา และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ human serum albumin standard ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับติดตามปฏิกิริยา คือช่วงเวลาอัตราการดูดกลืนแสงของทุกความเข้มข้นมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและให้ช่วงกว้างของการตรวจวัดมากที่สุด

3.5.7.5 การทดสอบชนิดและความแรงของเกลือ (ionic strength) ใน assay buffer เพื่อใช้ในวิธีที่พัฒนาขึ้น

การเกิดปฏิกิริยาทาง immunoassay ส่วนใหญ่มักเกิดในตัวกลางที่มีความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือมี pH อยู่ในช่วง 6-8 และมี ionic strength อยู่ในช่วง 150-170 mM ซึ่งเป็นสภาวะที่มีความใกล้เคียงกับสมดุลสารน้ำในร่างกายมนุษย์และทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ดีที่สุด ในทดลองนี้จึงเปรียบเทียบ assay buffer 2 ชนิดที่มีค่า pH เท่ากับ 7.4 ซึ่งเป็น pH ที่นิยมใช้ในการเตรียม buffer ทาง immunoassay มากที่สุดและช่วยรักษาความสมดุลของปฏิกิริยาได้ดี เนื่องจากมีค่าใกล้เคียงกับสารน้ำในร่างกายมากที่สุด (ในเลือดมี pH 7.3-7.4) ในการทดลองนี้เลือกใช้ 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 และ 20 mM Tris/HCL buffer pH 7.4 โดยให้มีส่วนประกอบของ 6% PEG คงที่ และเติม NaCl ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0, 50, 100, 150, 200, 250 mM เป็นองค์ประกอบในบัฟเฟอร์ จากนั้นจึงทำการตรวจวัดปริมาณ human serum albumin standard ที่ความเข้มข้น 0 และ 75 mg/L เพื่อเปรียบเทียบอัตราการดูดกลืนแสงของ

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดย และศึกษาว่า buffer ชนิดใดและความเข้มข้นของ NaCl เท่าใด ให้ความไวของการตรวจวัดที่ดีที่สุด โดยพิจารณาจากผลต่างของอัตราการดูดกลืนแสงระหว่างการมีหรือไม่มีอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง จึงเลือกชนิด buffer และ ionic strength นั้นมาทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.7.6 การทดสอบหาปริมาณ polyethylene glycol (PEG) ที่เหมาะสมใน assay buffer เพื่อใช้ในวิธีที่พัฒนาขึ้น

การเติม PEG ปริมาณที่เหมาะสมใน assay buffer จะช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากจะช่วยลดแรงผลักระหว่างโมเลกุลให้น้อยลงและคงสภาพการเกิดปฏิกิริยาแบบ particle enhance immunoassay ให้คงที่และง่ายต่อการวัดปฏิกิริยามากขึ้น ในการทดลองนี้ได้ศึกษา PEG ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% และ 12% และทดสอบกับ 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 ที่มี 200 mM NaCl เป็นส่วนประกอบ เพียงบัฟเฟอร์เดียว เนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้นก่อนหน้านี้ บัฟเฟอร์ดังกล่าวมีความเหมาะสมที่สุด ความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสม พิจารณาจากผลต่างของอัตราการดูดกลืนแสงระหว่างการเติม (75 mg/) หรือไม่เติมอัลบูมิน (0 mg/L)

3.5.7.7 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

โดยทั่วไป อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีให้เร็วขึ้น แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิมากเกินไปอาจทำลายโครงสร้างสารทางชีวภาพเช่นความสามารถในการจับกับแอนติเจนของแอนติบอดีได้ ดังนั้นการทดสอบเพื่อหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาให้สมบูรณ์มากขึ้น การทดลองนี้จึงใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิตั้งค่าอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาที่ 25°C, 30°C, 37°C, 40°C และ 42 °C โดยในแต่ละการทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะรอให้อุณหภูมิกึ่งที่เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาทีก่อนการตรวจวัด จากนั้นจึงทำการตรวจวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาของ human serum albumin standard ที่ความเข้มข้น 0 และ 75 mg/L กับทุกๆ อุณหภูมิ

3.5.7.8 การทดสอบหาความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ในหลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) อัลบูมินอิสระในปัสสาวะจะจับกับโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เติมเข้าไป เกิดเป็น antigen/antibody complex ก่อน หลังจากนั้นจะถูกแย่งจับโดย albumin immobilized beads ดังนั้นควรมีการศึกษาถึงความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่มีสัดส่วนเหมาะสมกับปริมาณ แอนติเจนอิสระและแอนติเจนบนผิว beads เพื่อให้มีการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มอย่างสมบูรณ์ และไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดี 6.5 $\mu\text{g/mL}$, 8.7 $\mu\text{g/mL}$, 13 $\mu\text{g/mL}$ และ 26 $\mu\text{g/mL}$ ผสมกับ human serum albumin standard ที่มีความเข้มข้น 0, 75 และ 150 mg/L ก่อนเติม albumin immobilized beads ลงไปแย่งจับโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เหลือจากขั้นตอนแรก แล้วเปรียบเทียบอัตราการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นว่าความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีเท่าใด ให้ความไวของปฏิกิริยามากที่สุด

3.5.8 การศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterization)

3.5.8.1 การทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)

ทดสอบโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ human serum albumin standard (mg/L) กับการเปลี่ยนแปลงของอัตราการดูดกลืนแสงต่ออนุภาที่ (dA/min) ที่ความยาวคลื่น 510 nm เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดไมโครอัลบูมินตามวิธีที่พัฒนาขึ้น ในการทดลองนี้ใช้ human serum albumin standard ละลายใน 0.9% NSS ให้ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ 0, 18.75, 37.5, 75, 150, 200 และ 300 mg/L และทำการตรวจวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาดูดกลืนแสงซ้ำกัน 2 ครั้งทุกความเข้มข้น เมื่อสิ้นสุดการตรวจค่าที่ได้ จะนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของ human serum albumin standard (แกน x) กับการเปลี่ยนแปลงของอัตราการดูดกลืนแสงต่ออนุภาที่ (แกน y)

3.5.8.2 การทดสอบหาค่า limit of detection (LOD)

เป็นการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์ได้ วิธีที่มี limit of detection (LOD) ต่ำๆ จะสามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดีหรือมีความไวในการตรวจวัดมาก (sensitivity) ในการทดลองใช้ 0.9% Normal saline แทนตัวอย่างที่ไม่มีอัลบูมินอิสระ แล้วทำการตรวจวัดเป็นจำนวน 10 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของอัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืน

ค่า LOD นิยามจากความเข้มข้นที่คำนวณจากกราฟมาตรฐาน โดยนำค่าสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของ blank 10 ครั้ง ลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นที่ 0 mg/L (B_0) และแทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

3.5.8.3 การทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (Interferences)

เป็นการทดสอบสารหรือกลุ่มของสารบางชนิดว่ามีผลรบกวนในการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยหลักการที่พัฒนาขึ้นหรือไม่ โดยนำสารที่อาจพบได้ในปัสสาวะ เช่น urea, creatinine, gamma globulin, hemoglobin, ampicillin, ascorbic acid และ glucose เป็นต้น เติมนลงในตัวอย่างปัสสาวะที่ทราบความเข้มข้นของอัลบูมิน 75 mg/L ทำการตรวจวัดและเปรียบเทียบค่าของอัลบูมินในปัสสาวะก่อนและหลังเติมสารรบกวนแต่ละตัว จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = (\text{Concentration recovered} / \text{Concentration added}) \times 100$$

Concentration recovered คือ ปริมาณอัลบูมินที่คำนวณได้ในปัสสาวะหลังเติมสารรบกวน Concentration added คือ ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่คำนวณได้ก่อนเติมสารรบกวน

3.5.8.4 การทดสอบหาค่าความเที่ยงตรงของการตรวจวัด (Precision and reproducibility)

ในการทดลองนี้ใช้ microalbumin liquid controls 2 levels (Randox Laboratories LTD, UK) ที่ทราบช่วงความเข้มข้น เป็นตัวแทนในการตรวจวัด โดยตรวจวัดระดับอัลบูมินทั้ง 2 levels ภายในวันเดียวกัน level ละ 20 ครั้ง (intra-assay) และตรวจวัด control ทั้ง 2 level ทุกวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 20 วัน (inter-assay) นำค่าความเข้มข้นของอัลบู

มินที่ตรวจวัดได้จาก control ทั้งสองระดับ มาหาค่าเฉลี่ย (mean), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation)

3.5.8.5 การทดสอบหาความคงตัวของ immobilized beads

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพการเกาะกลุ่ม และความคงตัวของ immobilized beads ที่เก็บอยู่ใน storage buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยทดสอบกับ human serum albumin standard ความเข้มข้น 0 และ 75 mg/L ทุกๆ 3-5 วันต่อเนื่องกันนับตั้งแต่วันแรก เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน โดยใช้ immobilized beads ชุดเดียวกันแล้วศึกษาว่าเมื่อเวลาผ่านไป beads ดังกล่าวยังคงมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา immunoagglutination หรือไม่ โดยดูจากค่าการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงเมื่อทดสอบกับอัลบูมินทั้งสองความเข้มข้น

3.5.8.6 การทดสอบความแปรปรวน ของการเตรียม immobilized beads

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพและความคงที่ของการตรึง beads ในแต่ละครั้งว่ามีความแปรปรวนมากน้อยเพียงใด (lot-to-lot variation) โดยนำ beads ที่ตรึงได้ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับสารควบคุมมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของอัลบูมิน 2 ระดับ (microalbumin liquid controls 2 levels, Randox Laboratories LTD) หลังจากทดสอบความเป็นเส้นตรงของการเตรียม immobilized beads แล้ว นำค่าตรวจวิเคราะห์ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (mean), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation)

3.5.8.7 การทดลองตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในผู้ป่วยเบาหวานเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

ทำการตรวจวัดตัวอย่างปัสสาวะจากกลุ่มประชากรซึ่งเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวาน จำนวน 246 คน โดยเก็บปัสสาวะแบบสุ่มมาปั่นตกตะกอนที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใส มาตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้น แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric immunoassay หรือ immunoturbidimetry ผลการตรวจปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของทั้งสองวิธีนี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติ Bland and Altman plot (138), Passing-bablok regression (139) และ Linear regression

การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

1. ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้นกับชุดน้ำยาที่ใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric immunoassay (Biosystems S.A., Spain) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Evolution 600) ทำการตรวจวัดตัวอย่างปัสสาวะที่เหลือจากห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวาน จำนวน 68 คน ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของน้ำยาที่เตรียมได้รวมถึงถึงวิธีการตรวจวัดว่าให้ผลที่ถูกต้องหรือไม่

2. ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยตรวจวัดด้วยเครื่อง portable fiber optic spectrometer เปรียบเทียบผลการตรวจวัดกับชุดน้ำยาที่ใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric immunoassay (Biosystems S.A., Spain) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Evolution 600) โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่เหลือจากห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวาน จำนวน 58 คน ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของเครื่องมือ portable fiber optic spectrometer ว่ามีความไวเพียงพอสำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาที่พัฒนาขึ้นหรือไม่

การทดลองในระดับภาคสนาม

ก่อนไปทำวิจัยระดับภาคสนาม ผู้วิจัยได้เตรียม beads และน้ำยาต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจวัดรายละเอียดตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 โดยเตรียมก่อนนำไปใช้ตรวจหนึ่งวัน ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองนำเครื่อง portable fiber optic spectrometer และน้ำยาที่พัฒนาขึ้นไปตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคเบาหวาน ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลเขาขลุงและโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลท่าผา อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี และโรงพยาบาลสมเด็จพระสังฆราชองค์ที่ 17 อ.สองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวนทั้งสิ้น 120 คน ($n = 120$) เปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการภายนอกที่ได้มาตรฐานที่ใช้หลักการ immunoturbidimetry และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automate analyzer (COBAS INTEGRA® 800, Roche) หรือ BECKMAN COULTER AU400, Beckman Coulter) ตามลำดับ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึง Human serum albumin บน carboxylated polystyrene beads

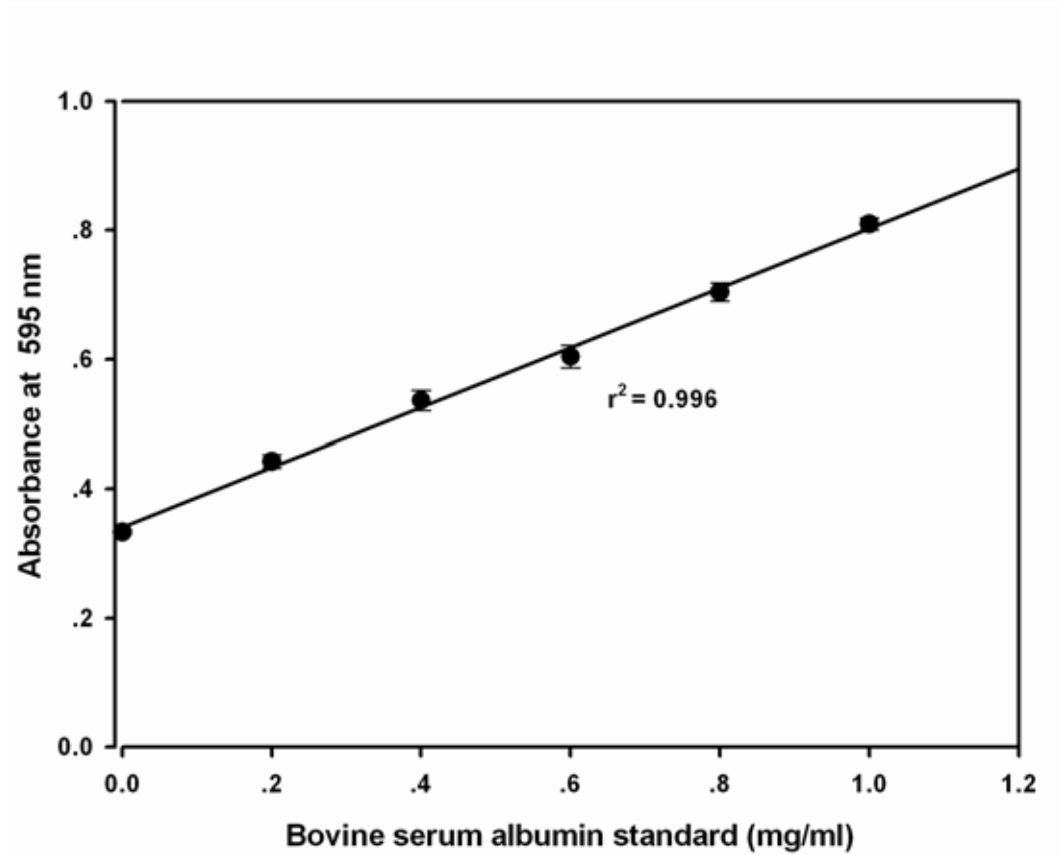
เพื่อเป็นการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของการตรึง human serum albumin บน beads ด้วยเทคนิคใหม่ในงานวิจัยนี้ว่าสภาวะและวิธีการสำหรับการตรึงโปรตีนเหมาะสม เพื่อนำ beads ที่ตรึงแล้วไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป โดยเปรียบเทียบจากความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายก่อนและหลังการตรึง โดยวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay โดยกราฟมาตรฐานจากการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1 ประสิทธิภาพการตรึงคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการตรึง (\%)} = \left\{ \frac{\text{โปรตีนก่อนตรึง (mg/mL)} - \text{โปรตีนหลังตรึง (mg/mL)}}{\text{โปรตีนก่อนตรึง (mg/mL)}} \right\} \times 100$$

จากผลการทดลองพบว่า การตรึงอัลบูมินบน beads แต่ละครั้งต่างเวลากัน ได้ % yield มากกว่า 80% ทุกครั้ง และจากการตรึงจำนวน 6 ครั้ง % yield มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 94.7 % และมี %CV เท่ากับ 6.14 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าสภาวะและวิธีการตรึง human serum albumin ตามวิธีที่ได้มีการพัฒนาขึ้นมีความเหมาะสม

ตารางที่ 4.1 แสดงประสิทธิภาพการตรึง human serum albumin บน beads จำนวน 6 ครั้ง

ครั้งที่	Protein ก่อนตรึง (mg/mL)	Protein หลังตรึง (mg/mL)	ประสิทธิภาพการตรึงโปรตีน (% yield)
1	0.58	0.01	83.1
2	0.58	0.03	94.8
3	0.59	0.02	96.6
4	0.61	0.01	98.4
5	0.59	0.01	98.3
6	0.61	0.02	96.7
Mean	0.59	0.02	94.7
SD	0.014	0.008	5.81
%CV	2.30	48.99	6.14

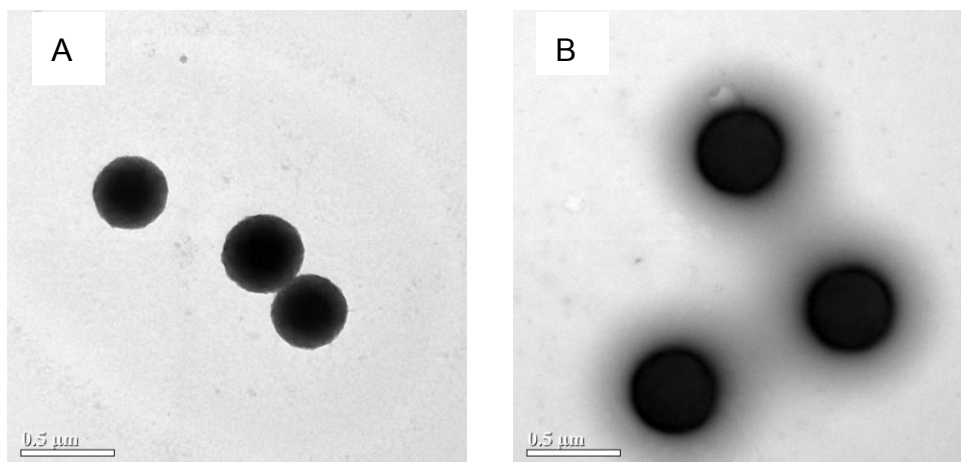


ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วย วิธี Bradford (n=2)

4.2 ผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพของ beads ก่อนตรึงและหลังตรึง human serum albumin โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM)

ก่อนทำการทดสอบลักษณะทางกายภาพของ beads ก่อนตรึงและหลังตรึง human serum albumin โดยใช้กล้อง TEM นั้นต้องผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างโดยการอังโอ Osmium tetroxide (OsO_4) เพื่อรักษาโครงสร้างของชั้นโปรตีนที่เคลือบบนผิว beads และทำให้เห็นความแตกต่างลักษณะทางกายภาพระหว่าง beads และชั้นของโปรตีนได้ชัดเจนขึ้น ในการทดลองนี้วัตถุที่ต้องการถ่ายภาพเป็น beads ที่มีความทึบแสง จึงเลือกการทำงานของกล้องให้ถ่ายภาพแบบ Bright-field image กำลังขยาย 6000 เท่า ซึ่งหลักการทำงานคือบริเวณที่ลำแสงอิเล็กตรอนส่องผ่านวัตถุที่มีความหนาแล้วถูกดูดซับอิเล็กตรอนไว้มากจะมีค่า atomic number สูง ภาพที่ปรากฏจะมีสีดำ ส่วนบริเวณที่ไม่มีวัตถุหรือวัตถุที่มีความบางลงมาภาพที่ปรากฏจะมีสีขาวหรือสว่างกว่า จึงทำให้เห็นความแตกต่างของวัตถุที่นำมาวิเคราะห์ได้ (136)

ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.2A พบว่า beads ก่อนตรึง human serum albumin ปรากฏเป็นวัตถุรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 0.5 ไมโครเมตร มีสีดำ ตัดกับบริเวณพื้นหลังของภาพซึ่งเป็นสีขาว ส่วน beads ที่ผ่านการตรึง human serum albumin แล้วจะปรากฏเงาสีเทา ล้อมรอบ beads อีกชั้นอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.2B) แสดงว่า human serum albumin ที่เคลือบอยู่บนผิว beads เป็นชั้นบางๆ หลายชั้น ทำให้มีค่า atomic number มากกว่าพื้นหลังที่ไม่มีวัตถุใดๆ ที่ดูดซับอิเล็กตรอนไว้ได้ แต่มีค่า atomic number น้อยกว่า beads ซึ่งเป็นโพลีเมอร์มีลักษณะทึบแสงและมีส่วนประกอบของโมเลกุลเล็กๆ สานกันอย่างหนาแน่นจึงดูดซับอิเล็กตรอนไว้ได้มากกว่า ทำให้สีของ human serum albumin ที่ปรากฏจางกว่าสีของ beads



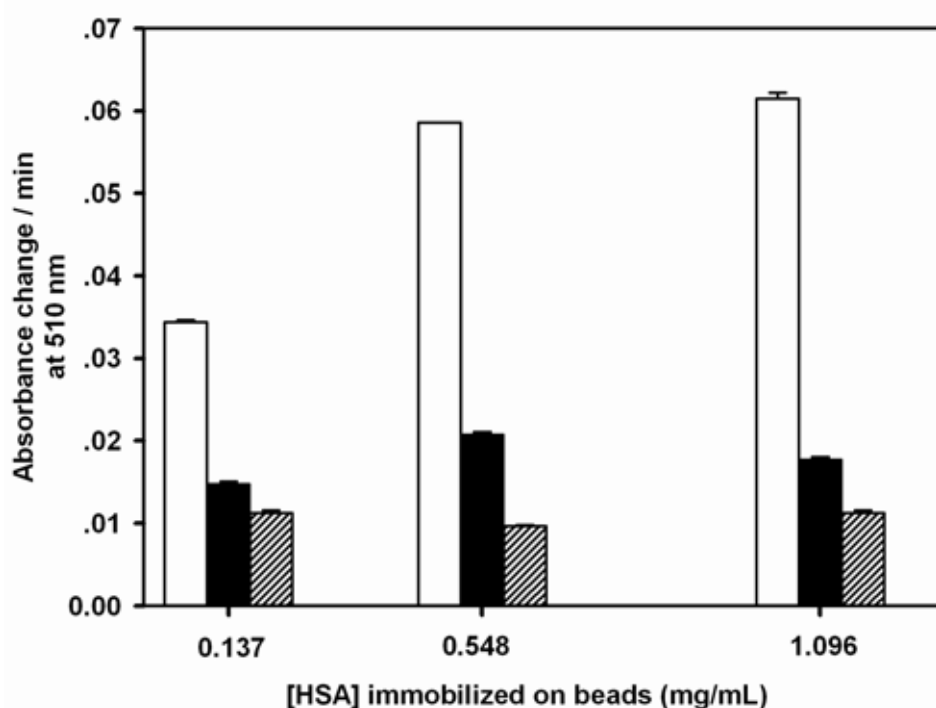
ภาพที่ 4.2 แสดงภาพถ่ายแบบ Bright-field image ของ beads ก่อนตรึง (A) และหลังตรึง (B) human serum albumin วิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM)

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ของน้ำยาและวิธีการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (evolution 600)

4.3.1 การทดสอบหาปริมาณ human serum albumin ที่เหมาะสมในการตรึง beads

การหาปริมาณที่เหมาะสมของโปรตีนเพื่อตรึงบน beads จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มและยืดอายุการใช้งาน beads ให้นานขึ้นเนื่องจากปริมาณโปรตีนที่เกาะบนผิว beads หลายชั้นมากเกินไปจะเพิ่มโอกาสของการหลุดร่อนออกจากผิว beads ได้ง่ายกว่าปริมาณโปรตีนที่ตรึงอย่างเหมาะสมและมีการเรียงตัวที่ดี นอกจากนี้โปรตีนที่หลุดร่อนออกมาอาจเกิดการเกาะกลุ่มกันเองเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง เมื่อนำ beads ที่ผ่านการตรึง human serum albumin ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.137, 0.548 และ 1.096 mg/mL มาทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับ human serum albumin standard ที่ความเข้มข้น 0, 75, 150 mg/L ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น (ภาพที่ 4.5) พบว่า beads ที่ตรึงด้วย HSA ที่มีความเข้มข้น 0.137 mg/mL ให้อัตราการดูดกลืนแสงค่อนข้างต่ำและไม่ค่อยแตกต่างกันทั้ง 3 ความเข้มข้นของ standard แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HSA ที่ตรึงบน beads เท่ากับ 0.548 mg/mL พบว่าอัตราการดูดกลืนแสงสูงขึ้นและแตกต่างกันอย่างชัดเจนในทุกความเข้มข้นของ standard ซึ่งเมื่อเทียบกับ beads ที่ตรึง HSA ด้วยความเข้มข้น 1.096 mg/mL พบว่าอัตราการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจากเดิมไม่มากนัก แต่ใช้

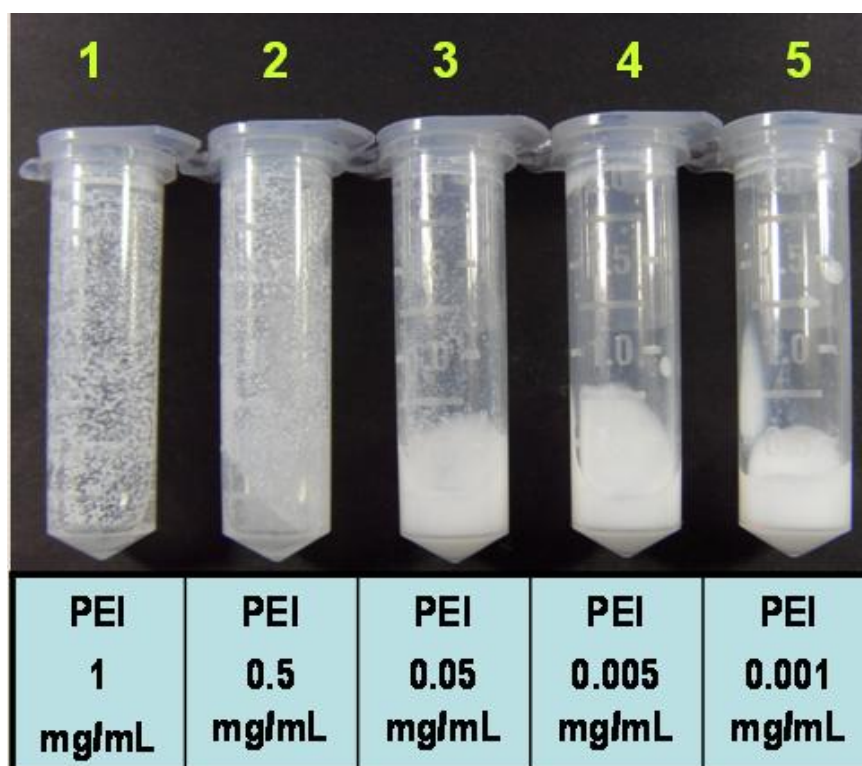
ปริมาณ HSA มากกว่าเดิมถึง 2 เท่า เมื่อพิจารณาร่วมกันระหว่างปริมาณ HSA ที่ใช้ในการตรึงกับ อัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของปฏิกิริยา พบว่า beads ที่ตรึงด้วย HSA ที่มีความเข้มข้น 0.548 mg/mL มีความเหมาะสมที่สุดเนื่องจากให้อัตราการดูดกลืนแสงที่สูงต่างกันอย่างชัดเจนในทุก ความเข้มข้นของ standard และใช้ปริมาณ HSA ในการตรึงไม่มากเกินไปจนอาจเกิดปฏิกิริยา เกาะกลุ่มกันเองได้ ดังนั้นปริมาณ human serum albumin ที่ใช้ตรึงบน beads เพื่อใช้ในการวิจัย นี้จึงเลือกความเข้มข้นเท่ากับ 0.548 mg/mL ตลอดการทดลอง



ภาพที่ 4.3 ผลของการตรึง human serum albumin ความเข้มข้นต่างๆ ต่้อัตราการเปลี่ยนแปลง การดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA เมื่อทดสอบกับ HSA 0 mg/L (□); 75 mg/L (■); 150 mg/L (▨). (n=2)

4.3.2 การทดสอบหาปริมาณ BPEI ที่เหมาะสมในการตรึง beads

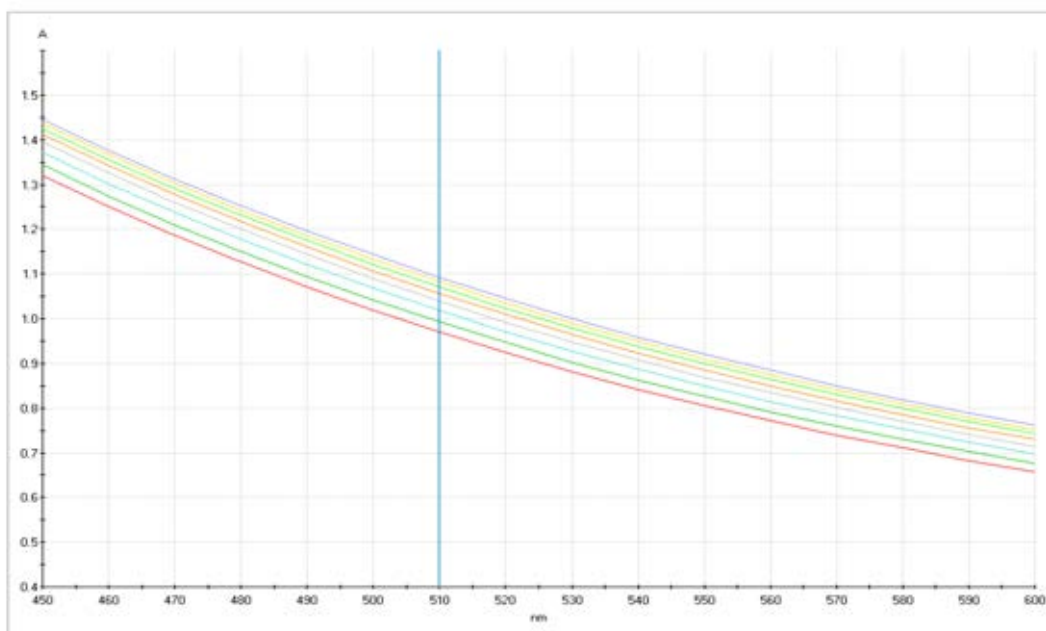
เมื่อนำ BPEI ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 0.5, 0.05, 0.005, 0.001 mg/mL ก่อนนำมาตรึงบน beads ตามขั้นตอนการตรึงโปรตีน และสังเกตความเป็นเนื้อเดียวกันด้วยตาเปล่าของ reagent beads หลังการเติม human serum albumin ลงไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.6 พบว่าการเติม BPEI ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.05 mg/mL ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มและตกตะกอนของ beads สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่เมื่อใช้ BPEI ความเข้มข้น 0.005 และ 0.001 mg/mL ไม่ทำให้ beads เกิดการเกาะกลุ่มและตกตะกอน แต่ BPEI ความเข้มข้น 0.001 mg/mL อาจมีปริมาณน้อยเกินไปไม่เพียงพอที่จะปกคลุมประจุลบของ carboxylated beads ได้ และทำให้เกิด non-specific adsorption ได้ ดังนั้นความเข้มข้นของ BPEI ที่เหมาะสมในการตรึงบน beads ในงานวิจัยนี้ คือ 0.005 mg/L และใช้สภาวะดังกล่าวตลอดการทดลอง



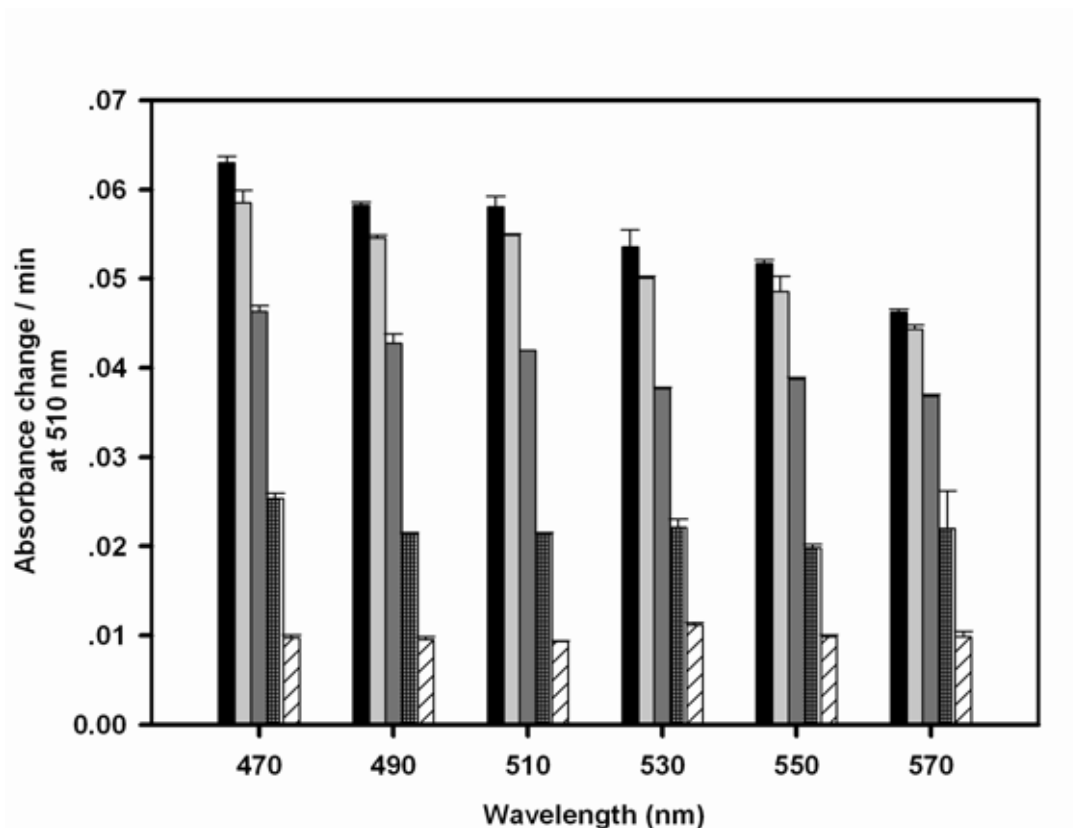
ภาพที่ 4.4 แสดงการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BPEI ในขั้นตอนการตรึง beads

4.3.3 การทดสอบหาช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม

นำ human serum albumin standard ความเข้มข้น 37.5 mg/L มาทำปฏิกิริยากับน้ำยา โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น จากนั้นนำไป scan สเปกตรัมโดยใช้โปรแกรม VISIONlite (scan) เลือกความยาวคลื่นตั้งแต่ 450-600 nm และบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที ดังภาพที่ 4.5 พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา PETINIA มีค่าลดลงเมื่อความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น แต่อัตราการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นสม่ำเสมอเท่าๆ กันในช่วง 2 นาทีแรก สอดคล้องกับผลการทดลองในภาพที่ 4.6 เมื่อนำ human serum albumin standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน PETINIA โดยติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 470 nm, 490 nm, 510 nm, 530 nm, 550 nm และ 570 nm เป็นเวลา 2 นาที พบว่าอัตราการดูดกลืนแสงในทุกๆความเข้มข้นของ standard มีค่าลดลง เมื่อเพิ่มความยาวคลื่น เมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมในด้านต่างๆ จึงเลือกความยาวคลื่น 510 nm ในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาในการทดลองขั้นต่อไปเนื่องจากให้ค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมไม่มากหรือน้อยจนเกินไป (อยู่ในช่วง 0.9-1.0) และอัตราการดูดกลืนแสงมีค่าแตกต่างกันอย่างชัดเจนในแต่ละความเข้มข้นของ human serum albumin standard



ภาพที่ 4.5 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา PETINIA สำหรับการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ตั้งแต่ความยาวคลื่น 450-600 nm

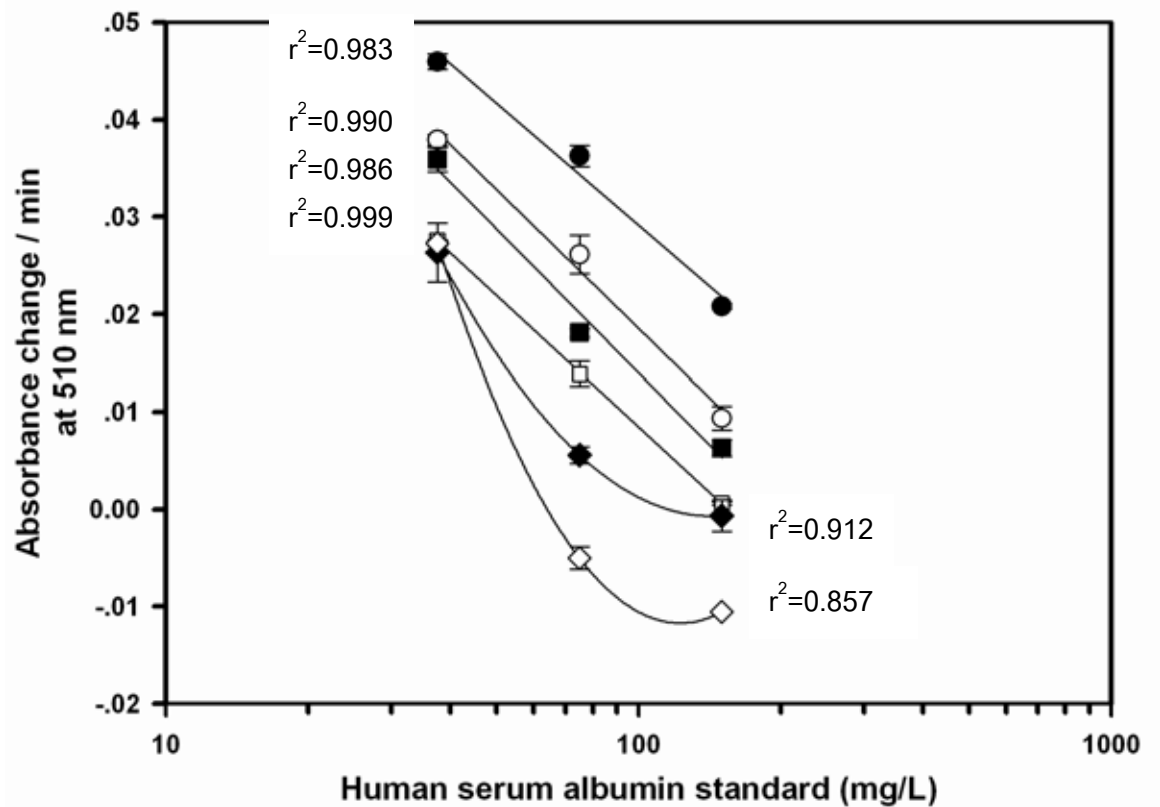


ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดกลืนแสงของ human serum albumin standard ที่ความเข้มข้น 0 mg/L (■); 18.75 (▒); 37.5 mg/L (■); 75 mg/L (▣); 150 mg/L (▤) กับความยาวคลื่นที่เปลี่ยนไป (n=2)

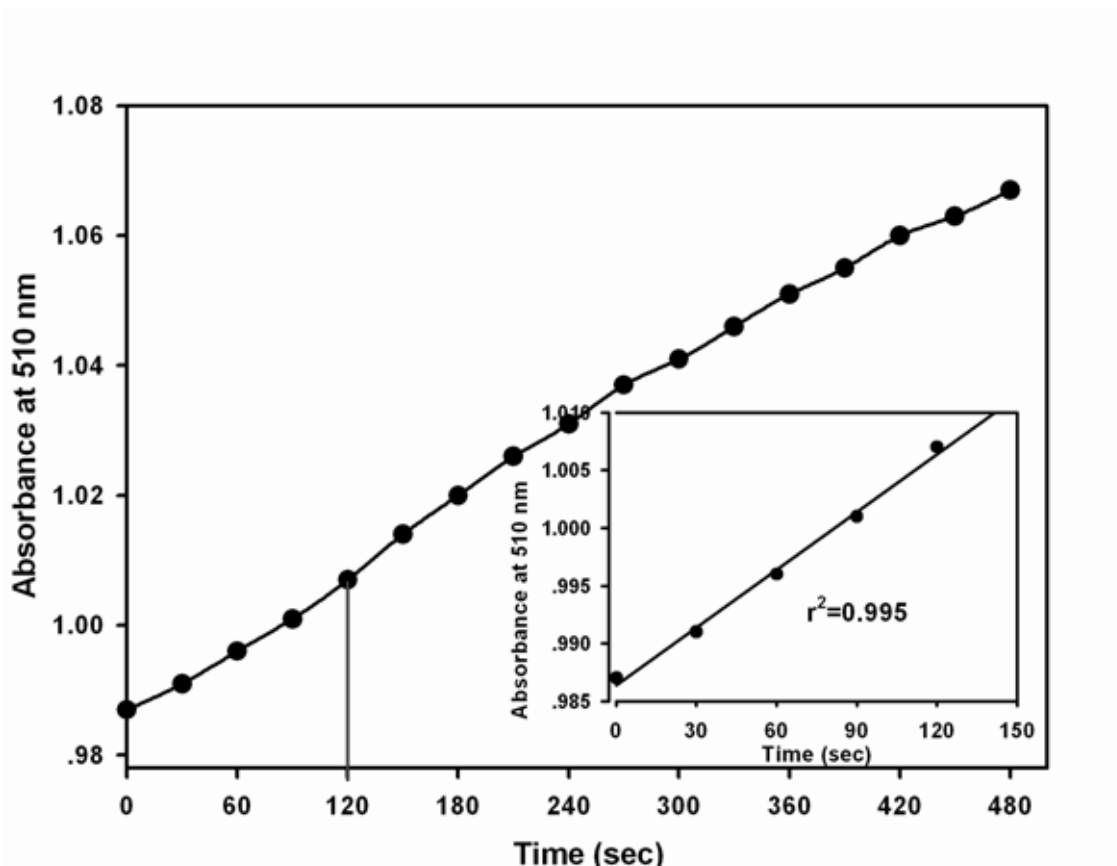
4.3.4 การทดสอบหาระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ระยะเวลาในการ incubate สารในปฏิกิริยาขั้นตอนแรกที่เวลา 0, 1, 2 และ 5 นาที ก่อนเติม immobilized beads ลงไปแย่งจับและติดตามการเกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 นาที (ภาพที่ 4.7) เมื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ human serum albumin standard พบว่ามีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงใกล้เคียงกัน (0-150 mg/L) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการ incubate สารในขั้นตอนแรกเป็น 10 และ 20 นาที พบว่าค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงลดลงเป็น 0.912 และ 0.857 ตามลำดับ อาจเกิดจากระยะเวลาการ incubate ที่นานเกินไปทำให้ปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกไม่สมดุลเพราะอัลบูมินในปัสสาวะจับกับแอนติบอดีจนหมด ไม่มีแอนติบอดีเหลือให้ immobilized beads เข้าไปแย่งจับ ทำให้มีความไวสูงในช่วงการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินความเข้มข้นน้อยๆ ส่งผลให้ช่วงกว้างของการตรวจวัดแคบลง เมื่อพิจารณาความ

เหมาะสมด้านต่างๆ แล้วจึงเลือกระยะเวลาการ incubate สารในปฏิกิริยาขั้นตอนแรก 2 นาทีและติดตามการเกิดปฏิกิริยาหลังเติม immobilized beads อีก 2 นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้อัตราค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นสม่ำเสมอและคงที่ โดยมีความชัน = 1.66×10^{-4} และมีค่า $r^2 = 0.995$ (ภาพที่ 4.8) และเวลาการตรวจวัดทั้งหมด 4 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง นั้นไม่นานเกินไป เหมาะสำหรับการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างจำนวนมาก



ภาพที่ 4.7 ผลของระยะเวลาการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับอัลบูมินก่อนเริ่มปฏิกิริยา ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา PETINIA เมื่อทดสอบกับ human serum albumin standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ : 0 (●), 1 (○), 2 (■), 5 (□), 10 (◆) และ 20 (◇) นาที (n=2)



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป (ภาพแทรก แสดงช่วงเวลาที่เกิดปฏิกิริยาเป็นเส้นตรง ($r^2 = 0.995$ ค่าความชัน = 1.66×10^{-4})

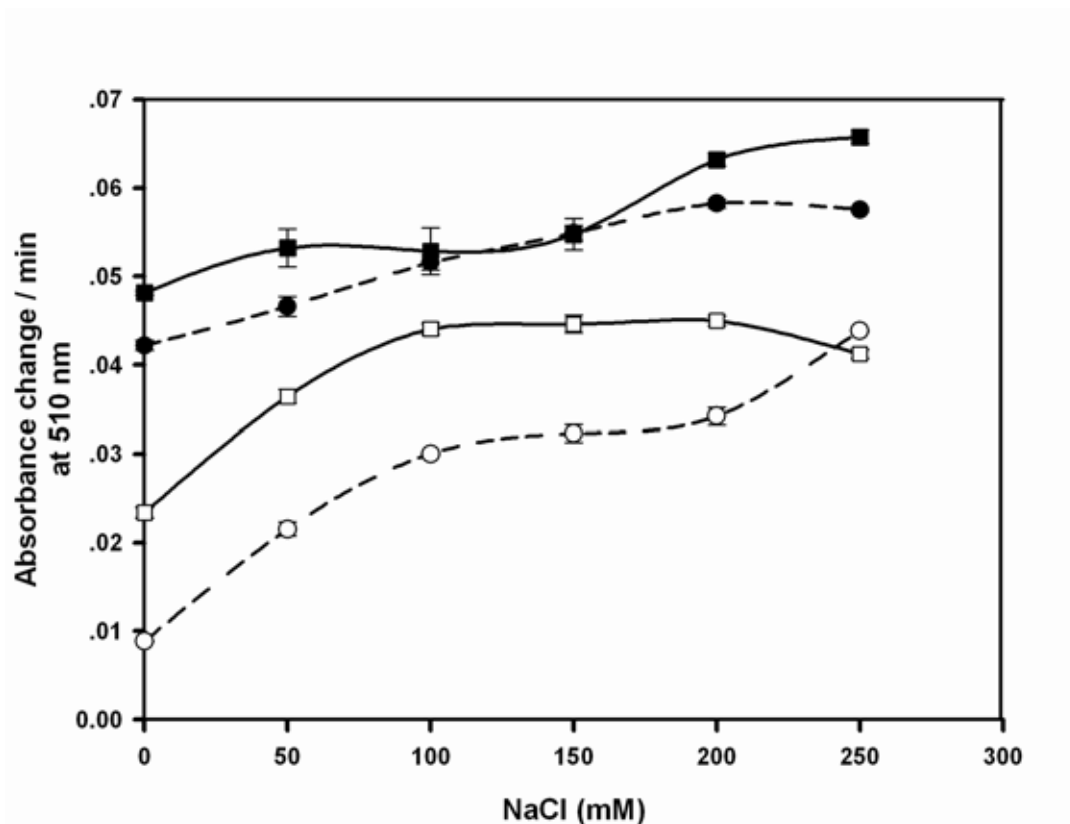
4.3.5 ผลการทดสอบชนิดและความแรงของเกลือ (Ionic strength) ใน assay buffer

ในทดลองได้ทำการเปรียบเทียบ assay buffer 2 ชนิดที่มีค่า pH เดียวกันคือเท่ากับ 7.4 ซึ่งเป็น pH ที่นิยมใช้ในการเตรียม buffer ทาง immunoassay มากที่สุดและช่วยรักษาความสมดุลของปฏิกิริยาได้ดีเนื่องจากมีค่าใกล้เคียงกับสารน้ำในร่างกายมากที่สุด การทดลองนี้เลือกใช้ 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 และ 20 mM Tris/HCl buffer pH 7.4 บัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดเติม 6% PEG เป็นองค์ประกอบ และทดสอบกับเกลือ (NaCl) ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.9 พบว่าเมื่อใช้ assay buffer ชนิด 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 (เส้นประ) เมื่อเติม NaCl เพิ่มขึ้นจนถึง 200 mM อัตราการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เป็น 250 mM ไม่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาของ 0 mg/L HSA

ส่วน assay buffer ชนิด 20 mM Tris/HCl buffer pH 7.4 (เส้นทึบ) เมื่อทดสอบกับ standard albumin ทั้ง 2 ความเข้มข้น พบว่าอัตราการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของ NaCl ประมาณ 0-50 mM แต่เมื่อความเข้มข้นของ NaCl 100-150 mM พบว่าอัตราการดูดกลืนแสงค่อยๆ คงที่ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl 200-250 mM พบว่าอัตราการดูดกลืนแสงของ standard ทั้ง 2 ความเข้มข้นกลับเพิ่มขึ้นและลดลงไม่เป็นไปในแนวทางเดียวกันอย่างชัดเจน

จากผลการทดลองดังกล่าว จะเห็นได้ว่าการใช้ assay buffer ชนิด 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 ที่ 200 mM NaCl และ 6% PEG เป็นองค์ประกอบ มีความไวสูงสุดเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์กับอัลบูมินความเข้มข้น 0 และ 75 mg/L ดังนั้นจึงใช้บัฟเฟอร์ชนิดดังกล่าวในการทดลองต่อไป

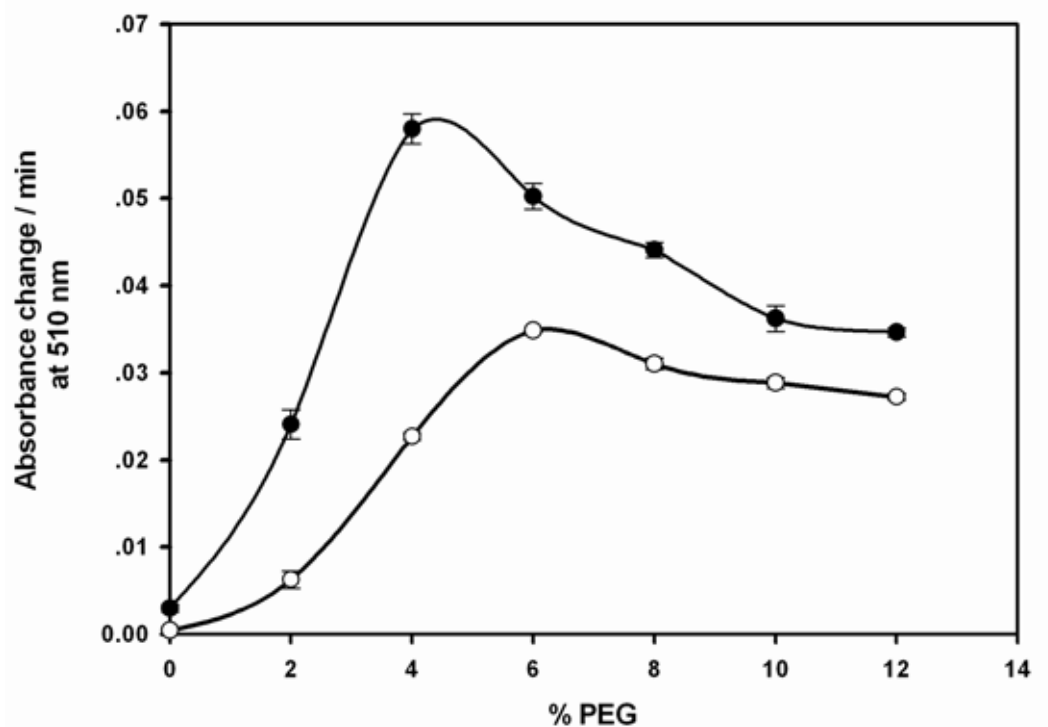


ภาพที่ 4.9 ผลของการเติม NaCl ใน assay buffer ต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA : 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 + 6% PEG (เส้นประ) ; 20 mM Tris/HCL buffer pH 7.4 + 6% PEG (เส้นทึบ) เมื่อทดสอบกับ 0 mg/L (■, ●) และ 75 mg/L (□, ○) (n=2)

4.3.6 ผลการทดสอบหาปริมาณ polyethylene glycol (PEG) ที่เหมาะสมใน assay buffer

Assay buffer ที่ใช้ในปฏิกิริยาด้าน immunoassay ส่วนใหญ่มักมีส่วนผสมของ PEG ในปริมาณที่เหมาะสมลงไปด้วย เนื่องจากการเติม PEG ลงในน้ำหรือตัวกลางที่เป็นของเหลวจะช่วยลดแรงผลักระหว่างโมเลกุลให้น้อยลงจึงสามารถเพิ่มอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาได้ ในการทดลองนี้จึงทดสอบผลของ PEG ความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 0-12% ใน assay buffer ต่ออัตราการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา PETINIA จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่า assay buffer ที่ไม่มีการเติม มีอัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงน้อยมากจนแทบไม่เกิดปฏิกิริยา แต่เมื่อเติม PEG ลงไปใน assay buffer ความเข้มข้นตั้งแต่ 2-4 % พบว่าอัตราการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อทดสอบกับอัลบูมินทั้งสองความเข้มข้น และเมื่อ PEG ปริมาณ

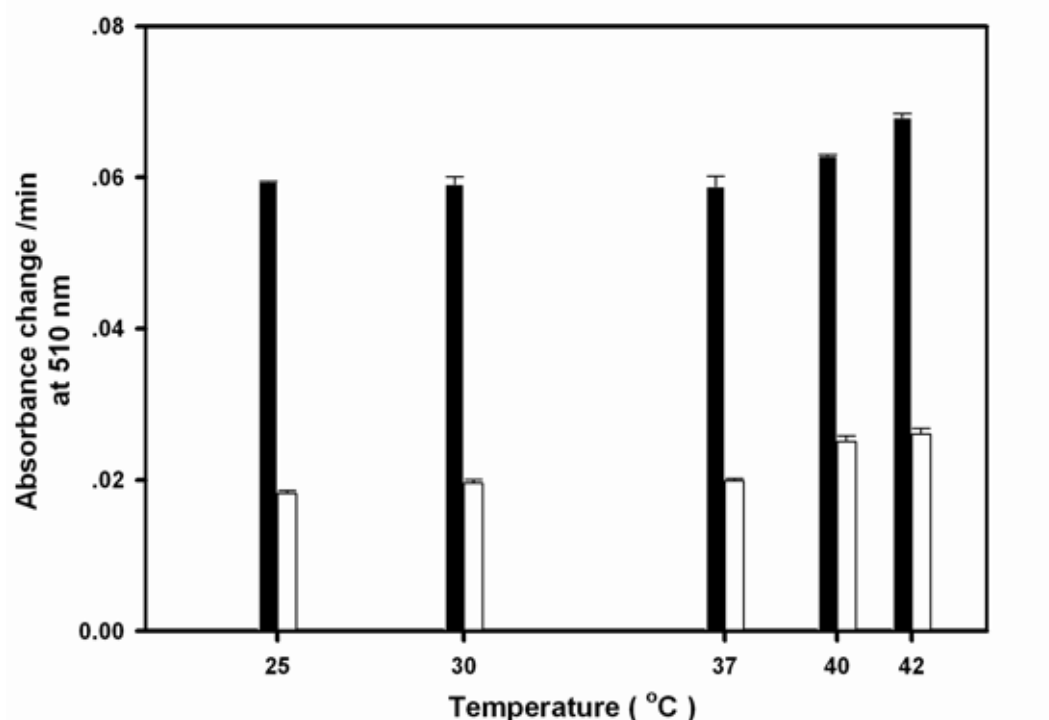
มากกว่า 4% (PEG ตั้งแต่ 6-12 %)ทำให้อัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณ PEG ที่มากเกินไปจนทำให้ buffer มีความหนืดและขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาเมื่อผสมกับสารอื่นๆ จะเห็นได้ว่า assay buffer ที่มี PEG 4% ทำให้ความไวของปฏิกิริยา PETINIA สูงสุด สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงได้แตกต่างกันมากที่สุด เมื่อทดสอบกับการมีหรือไม่มีการแย่งจับกับอัลบูมินในปฏิกิริยา ดังนั้นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้คือ 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 ที่มี NaCl 200 mM และ 4% เป็นองค์ประกอบ และใช้บัฟเฟอร์นี้ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 4.10 ผลของการเติม PEG ใน assay buffer ต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA เมื่อทดสอบกับ HSA 0 mg/L (●) และ 75 mg/L (○) (n=2)

4.3.7 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

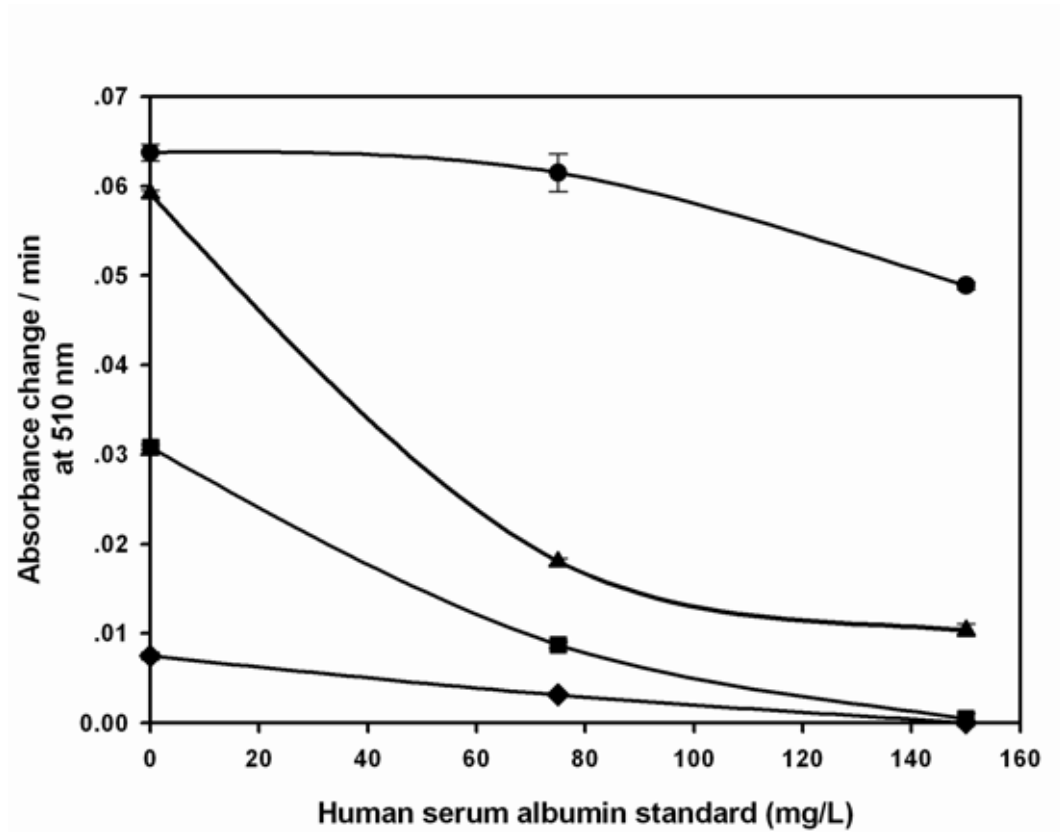
อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมี เพราะการเพิ่มอุณหภูมิทำให้โมเลกุลของสารมีพลังงานสูงพอที่ชนกันแล้วทำให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น จึงทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีเพิ่มขึ้น แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิมากเกินไปอาจทำลายโครงสร้างสารทางชีวภาพได้ การทดลองนี้จึงใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิตั้งค่าอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาที่ 25°C, 30°C, 37°C, 40°C และ 42 °C ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีทั่วไป จากผลการทดลองพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยา PETINIA ไม่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิช่วง 25°C- 37°C แต่มีผลเล็กน้อยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40°C และ 42 °C อย่างไรก็ตาม ความไวของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40°C และ 42 °C เมื่อทดสอบกับอัลบูมินความเข้มข้น 0 mg/L และ 75 mg/L มีค่าใกล้เคียงกับการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C และเมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ paired *t*-test ($P < 0.05$) พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ที่ 37°C สำหรับปฏิกิริยา PETINIA



ภาพที่ 4.11 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA เมื่อทดสอบกับ HSA 0 mg/L (■) และ 75 mg/L (□) (n=2)

4.3.8 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

สัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างความเข้มข้นของแอนติเจนและโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ในหลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) เป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากมีผลต่อความไวและช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวิเคราะห์ โดยต้องทดสอบหาสภาวะที่แอนติเจนและแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มอย่างสมบูรณ์และไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ในการทดลองนี้เลือกทดสอบความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดี 6.5 $\mu\text{g/mL}$, 8.7 $\mu\text{g/mL}$, 13 $\mu\text{g/mL}$ และ 26 $\mu\text{g/mL}$ โดยผสมกับ human serum albumin standard ความเข้มข้น 0, 75 และ 150 mg/L ก่อนเติม immobilized beads ลงไปแย่งจับแอนติบอดีที่เหลือจากขั้นตอนแรก ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เติมลงไป ในปฏิกิริยา โดยความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีเท่ากับ 13 $\mu\text{g/mL}$ ให้ค่าความต่างของอัตราการดูดกลืนแสงดีที่สุดและลดลงอย่างชัดเจนเป็นสัดส่วนผกผันกับความเข้มข้นของ human serum albumin standard ส่วนความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีเท่ากับ 26 $\mu\text{g/mL}$ ให้ค่าอัตราการดูดกลืนแสงของ standard ทั้ง 3 ความเข้มข้นสูงที่สุดแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ albumin standard มากขึ้น กลับพบว่าอัตราการดูดกลืนแสงลดลงเพียงเล็กน้อย ไม่ค่อยเห็นความแตกต่างมากนัก อาจเกิดจากความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีมากเกินไป และจับกับ immobilized beads ได้เต็มที่แล้ว ทำให้เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มสูงใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้นของ standard ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลบูมินเท่ากับ 13 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยวิธี PETINIA ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ เนื่องจากได้กราฟมาตรฐานที่มีความไวสูง มีความเป็นเส้นตรงที่กว้างเหมาะสมและครอบคลุมระยะไมโครอัลบูมินที่มีความสำคัญทางคลินิก

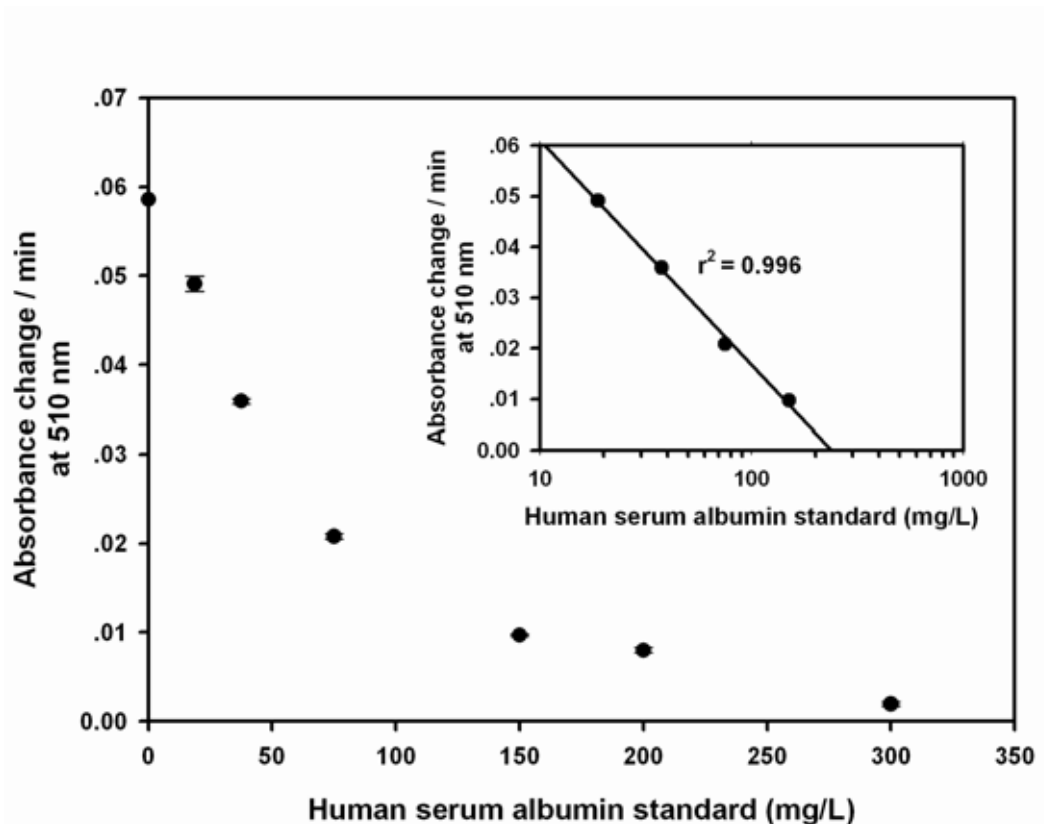


ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เติมในปฏิกิริยา PETINIA ต่อความไวและช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด ความเข้มข้นของแอนติบอดี 6.5 µg/mL (◆); 8.7 µg/mL (■); 13 µg/mL (▲) และ 26 µg/ml (●) (n=2)

4.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาได้ (Characterization)

4.4.1 ผลการทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)

จากสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยา PETINIA สำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ อุณหภูมิ 37°C โดยใช้ 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 ที่มี 4% PEG และ 200 mM NaCl เป็น assay buffer ติดตามการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 510 nm เป็นเวลา 2 นาที ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.13 พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟที่สร้างแบบ semi-log scale อยู่ในช่วง 0-150 mg/L ($r^2 = 0.996$) โดยมีสมการเส้นตรงเป็น $x = (y-0.1052)/-0.0443$ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ human serum albumin standard เป็น 200 mg/L พบว่าอัตราเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงเริ่มคงที่และไม่ค่อยแตกต่างจากความเข้มข้นของอัลบูมินที่ 150 mg/L และที่อัลบูมินเข้มข้น 300 mg/L อัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนน้อยมากจนแทบไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าอาจเกิดจากปริมาณอัลบูมินที่เติมเข้าไป มีปริมาณมากเกินไปจนทำให้จับกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีปริมาณจำกัดจนหมด เมื่อเติม immobilized beads ลงไปเพื่อแย่งจับกับแอนติบอดีจึงไม่เกิดการสานกันเป็นร่างแห ดังนั้นด้วยวิธีที่พัฒนาได้ในงานวิจัยนี้ ช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดคืออัลบูมินความเข้มข้น 0-150 mg/L ซึ่งช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดอัลบูมินโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ครอบคลุมการวินิจฉัยในคนปกติและผู้ที่มีภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยไม่ต้องเจาะจางส่งตรวจ และมีความกว้างของช่วงการตรวจวัดใกล้เคียงกับหลักการทั่วไปในห้องปฏิบัติการ เช่น immunoturbidimetry (79, 140) และ particle enhanced immunoassay (28, 95) ซึ่งอยู่ในช่วง 2-260 mg/L



ภาพที่ 4.13 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้น ภาพแทรก แสดงช่วงความเป็นเส้นตรง 0-150 mg/L ($r^2 = 0.996$) ($n=2$)

4.4.2 ผลการทดสอบหาค่า limit of detection (LOD)

ค่า LOD จากการทดลองนี้ นิยามมาจากความเข้มข้นที่คำนวณจากกราฟมาตรฐาน โดยนำค่าสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของ blank 10 ครั้ง ลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นที่ 0 mg/L (B_0) และแทนค่าในสมการเส้นตรง ผลการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยการตรวจวัดปริมาณ MAU ด้วยหลักการ PETINIA ในงานวิจัยนี้มีค่า LOD เท่ากับ 7.14 mg/L ซึ่งมีความไวเพียงพอสำหรับการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะของคนปกติและผู้ป่วยที่มีภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแล้ว

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์หาค่า limit of detection ของการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน

ค่าทางสถิติ	ผลการทดสอบการตรวจวัดไมโครอัลบูมิน
$B_0(\text{mean})$	0.059941
SD blank	0.0016584
3SD blank	0.004975
$B_0 - 3SD$	0.054966 หรือ ~ 0.055
สมการ $y = ax + b$	$0.055 = -0.041x + 0.090$
Limit of detection (x)	0.854
Limit of detection (mg/L)	$\text{Log}(x) = 0.854$ $X = 7.14 \text{ mg/L}$

4.4.3 ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (Interference)

เป็นการทดสอบสารหรือกลุ่มของสารบางชนิดที่มีผลรบกวนต่อวิธีการตรวจไมโครอัลบูมิน ในปัสสาวะ โดยนำสารที่อาจพบได้ในปัสสาวะ เช่น urea, creatinine, gamma globulin, hemoglobin, ampicillin, ascorbic acid และ glucose เป็นต้น โดยค่า % Recovery ในช่วง 95-105 % เป็นค่าที่ยอมรับได้ว่าสารที่นำมาทดสอบไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ ผลการตรวจวิเคราะห์สารรบกวนดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า 500 mg/L uric acid และ 5000 mg/L KCL รบกวนการตรวจวัดไมโครอัลบูมินเพียงเล็กน้อย โดยมี % Recovery เท่ากับ 105.8 % ส่วนสารที่นำมาทดสอบตัวอื่นๆ ได้แก่ 5000 mg/L urea, 1000 mg/L creatinine, 1000 mg/L gamma globulin, 50 mg/L hemoglobin, 10 mg/L ampicillin, 150 mg/L ascorbic acid, 10000 mg/L glucose และ 6.25 mg/L bilirubin ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญโดยมี % Recovery อยู่ในช่วง 95-102.6 %

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยาตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้น

สารที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารรบกวน (mg/L)	%Recovery
Urea	5000	99.1
Creatinine	1000	102.6
Uric acid	500	105.8
NaCl	1000	100.5
KCL	5000	105.8
Ascorbic acid	150	100.3
Glucose	10000	100.0
Gamma globulin	1000	95.0
Hemoglobin	50	100.8
Bilirubin	6.25	102.0
Ampicillin	10	97.1

4.4.4 ผลการทดสอบหาค่าความเที่ยงตรงของการตรวจวัด (Precision and reproducibility)

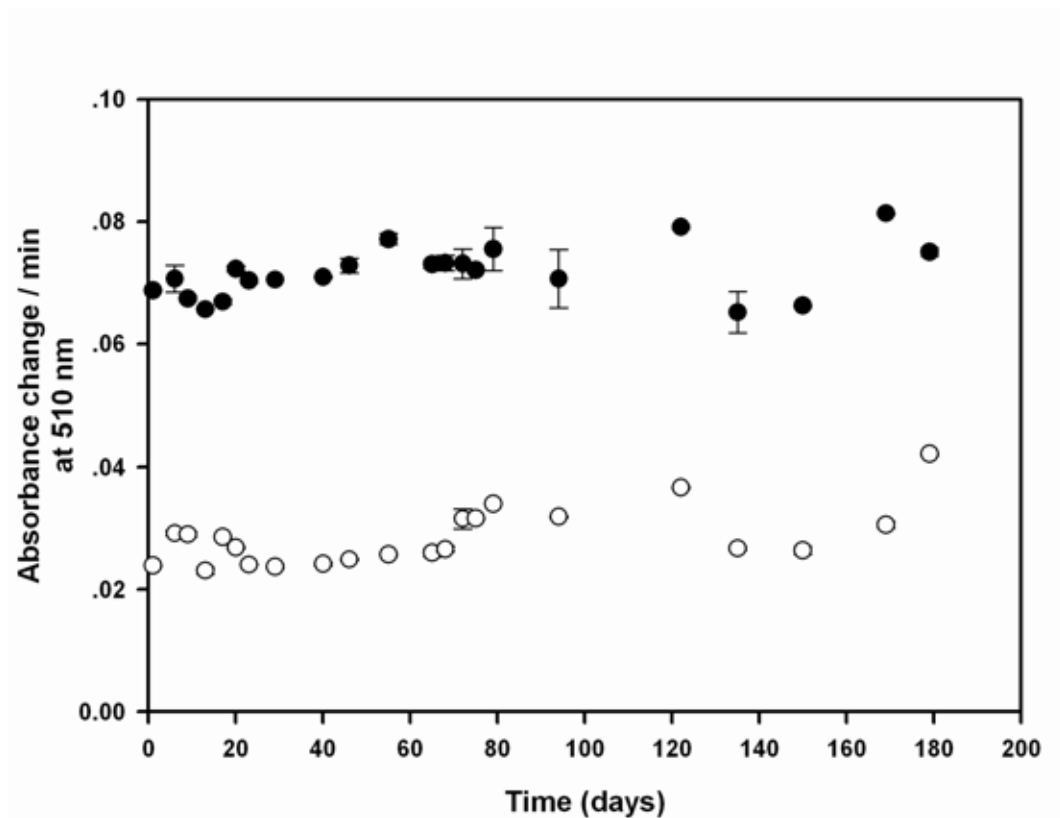
ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า %CV ของการวิเคราะห์แบบ intra-assay คือ 7.2% และ 2.2% ที่ความเข้มข้นของ microalbumin liquid controls เท่ากับ 38.3 และ 153.4 mg/L ตามลำดับ ส่วน %CV ของการวิเคราะห์แบบ inter-assay คือ 9.5% และ 3.1% ที่ความเข้มข้นของ microalbumin liquid controls เท่ากับ 30.4 และ 132.9 mg/L ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทดสอบหาค่าความเที่ยงตรงของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้น

Assay type	n	Mean \pm SD (mg/L)	%CV
Intra-assay	20	38.3 \pm 2.8	7.2
	20	153.4 \pm 3.3	2.2
Inter-assay	20	30.4 \pm 2.9	9.5
	20	132.9 \pm 4.2	3.1

4.4.5 ผลการทดสอบหาความคงตัวของ immobilized beads

Immobilized beads ที่พัฒนาขึ้นควรมีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มและมีความคงตัวตามระยะเวลาที่เหมาะสม โดยทั่วไปควรมีความคงตัวไม่น้อยกว่า 4 เดือน (104) Immobilized beads ที่ยังไม่ใช้งานต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อป้องกันโปรตีนที่ตรึงบนผิว beads ถูกทำลาย และช่วยยืดอายุการใช้งานของ beads นานขึ้น ในการทดลองนี้ใช้ immobilized beads ชุดเดียวกันตลอดการทดลอง การทดสอบความคงตัวของ beads จะเปรียบเทียบจากอัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบกับอัลบูมินมาตรฐานความเข้มข้น 0 และ 75 mg/l และบันทึกค่า $\Delta A/\text{min}$ ของการตรวจวัดแต่ละครั้งต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน จากกราฟพบว่าในช่วงแรกของการเก็บ beads เมื่อนำมาวัดอัลบูมินด้วยปฏิกิริยา PETINIA ได้ค่า $\Delta A/\text{min}$ ที่ค่อนข้างคงที่และไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อระยะเวลาผ่านไปประมาณ 4 เดือน อัตราการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลงบ้างเล็กน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บ immobilized beads ไว้เป็นเวลาประมาณ 6 เดือน ยังมีความไวของการตรวจวัดที่ไม่แตกต่างจากเดิม สำหรับการตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้น 0 mg/L มีค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสง 0.0717, SD=0.0011, %CV= 1.51 ส่วนการตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้น 75 mg/L มีค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสง 0.0285, SD= 0.00035, %CV=1.26



ภาพที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุการใช้งานของ immobilized beads (วัน) และ อัตราการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยา PETINIA เมื่อทดสอบกับอัลบูมินความเข้มข้น 0 mg/L (●) และ 75 mg/L (○) (n=2)

4.4.6 ผลการทดสอบความแปรปรวน ของการเตรียม immobilized beads

การตั้งโปรตีนบน beads ต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนทำให้การเตรียม immobilized beads ในแต่ละครั้งอาจมีความแตกต่างกันทางคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้น การทดสอบประสิทธิภาพและความคงที่ของการตั้ง beads จึงมีความสำคัญเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของ immobilized beads ให้ได้มาตรฐานใกล้เคียงกันที่สุดในแต่ละครั้งก่อนนำไปใช้งาน ผลการทดลองพบว่า หลังการเตรียม immobilized beads แต่ละครั้งเมื่อนำไปทดสอบตรวจวัดอัลบูมินจาก microalbumin liquid controls ทั้ง 2 levels โดยได้ทำการทดสอบจากการเตรียม beads จำนวน 6 ครั้ง พบว่าการตั้งอัลบูมินบน beads โดยวิธีในงานวิจัยครั้งนี้ สามารถตรวจวัด microalbumin control อยู่ในช่วงที่กำหนดทั้ง 2 ระดับทุกครั้ง และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 35.14 mg/L และ 146.12 mg/L ที่ level 1 และ level 2 ตามลำดับ ส่วนค่า %CV เท่ากับ 8.24 และ 8.86 mg/L ที่ level 1 และ level 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความแปรปรวน ของ immobilized beads จำนวน 6 ครั้ง

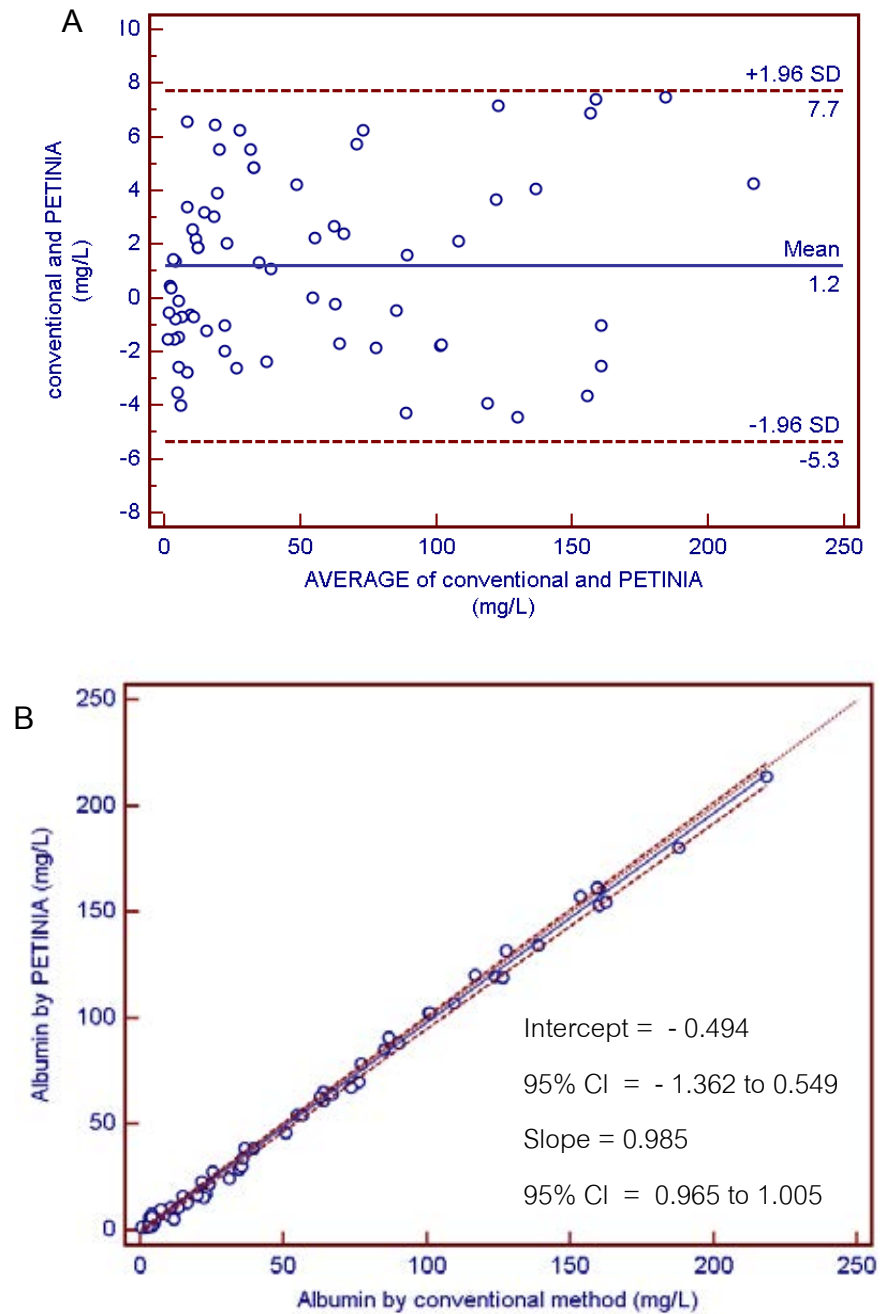
ครั้งที่ตรึง โปรตีนบน beads	ผลการตรวจวัดอัลบูมินจาก Control sample (mg/L)	
	Level I (769MA) Mean = 33.1mg/L (26.5-39.7 mg/L)	Level II (770MA) Mean = 154.1mg/L (123.3-184.9 mg/L)
1	29.93	158.45
2	37.39	136.36
3	33.59	131.41
4	37.25	137.24
5	36.26	162.8
6	36.41	150.46
Mean	35.14	146.12
SD	2.89	12.96
%CV	8.24	8.86

4.5 ผลการทดลองตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในผู้ป่วยเบาหวานเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

4.5.1 การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

4.5.1.1 ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้นกับชุดน้ำยาที่ใช้หลักการ *particle-enhanced turbidimetric immunoassay* โดยใช้เครื่อง *laboratory spectrophotometer*

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของน้ำยาที่เตรียมได้รวมถึงวิธีการตรวจวัดว่าให้ผลที่ถูกต้องหรือไม่ ทำการตรวจวัดตัวอย่างปัสสาวะจากกลุ่มประชากรซึ่งเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 68 คน โดยใช้ปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่มมาปั่นตกตะกอนที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใส มาตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวัดที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ (*conventional method*) ซึ่งใช้หลักการ *particle-enhanced turbidimetric immunoassay* (BioSystems, Barcelona, Spain) โดยเครื่อง *spectrophotometer* (Evolution 600) ผลการตรวจปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของทั้งสองวิธี เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Bland and Altman plot พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น ไม่มี bias ของการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากผลต่างระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปยังอยู่ในช่วง ± 1.96 SD (ภาพที่ 4.15A) นอกจากนั้นการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธี ยังได้มีการใช้สถิติ Passing-bablok regression (ภาพที่ 4.15B) พบว่าสมการ Passing-bablok regression คือ $y = 0.985x - 0.494$ ($y = ax + b$) และที่ช่วงค่าความเชื่อมั่น 95% ค่าความชัน (slope) ใช้สำหรับทดสอบสมมุติฐานก็ต่อเมื่อช่วงความเชื่อมั่นสำหรับ a มีค่า 1 อยู่ด้วย ผลจากกราฟพบว่าค่าความชันเท่ากับ 0.985 อยู่ในช่วง 0.965 ถึง 1.005 ซึ่งมีค่า 1 อยู่ในช่วงดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าสามารถยอมรับค่าความชันของสมการที่มีค่าไม่ต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และค่าจุดตัดแกน y ซึ่งใช้ทดสอบสมมุติฐานว่า $b = 0$ ซึ่งจะยอมรับสมมุติฐานถ้าช่วงความเชื่อมั่นสำหรับจุดตัดนั้นมีค่า 0 อยู่ด้วยในการทดลอง ค่าจุดตัดแกน y มีค่าเท่ากับ -0.494 อยู่ในช่วง -1.362 ถึง 0.549 ซึ่งมีค่า 0 อยู่ในช่วงดังกล่าว ดังนั้นสรุปได้ว่าค่าจุดตัดแกน y จากสมการข้างต้น มีค่าไม่ต่าง 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

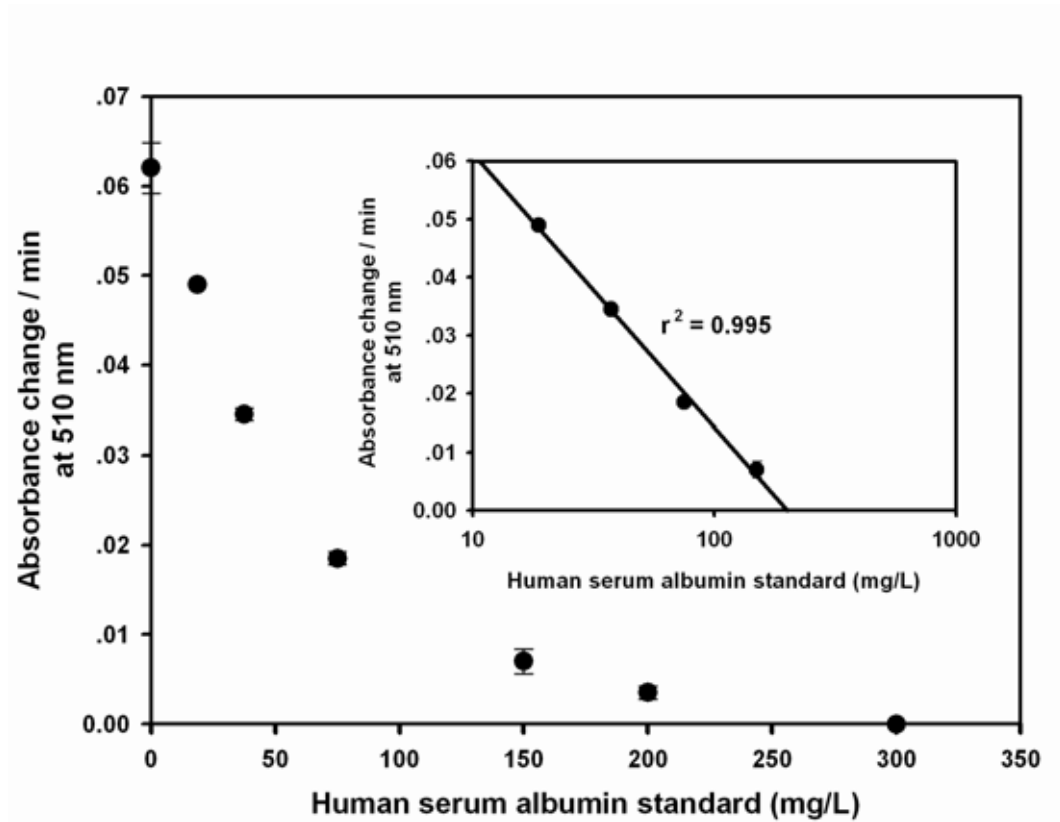


ภาพที่ 4.15 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในระบบ batch ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้สถิติ Bland and Altman plot (A) และ Passing-bablok regression (B)

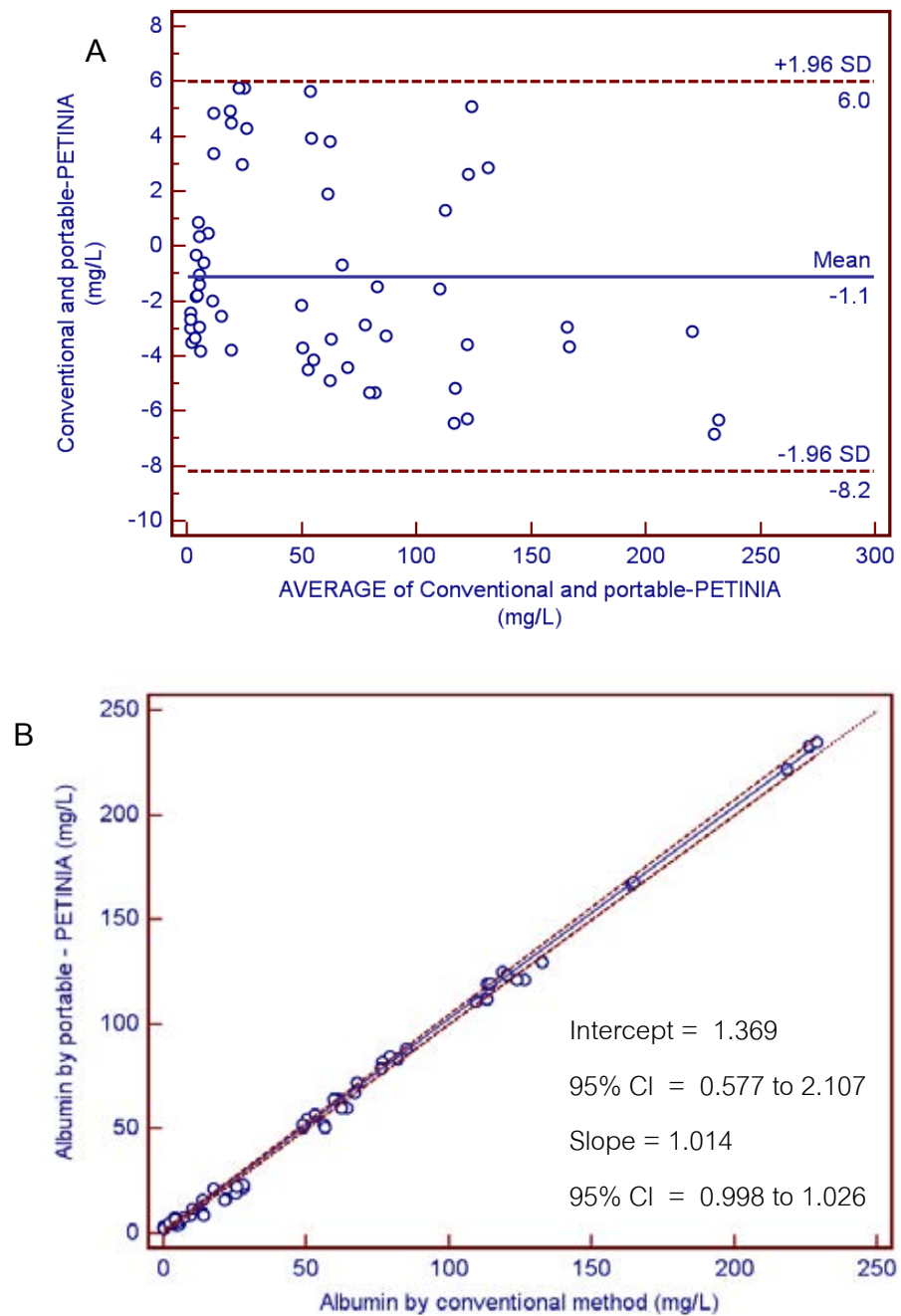
4.5.1.2 ตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่อง *portable spectrometer* กับชุดน้ำยาที่ใช้หลักการ *particle-enhanced turbidimetric immunoassay* โดยใช้เครื่อง *laboratory spectrophotometer*

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของเครื่องมือ *portable fiber optic spectrometer* ว่ามีความไวเพียงพอสำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาที่พัฒนาขึ้นหรือไม่

เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและทดสอบคุณสมบัติในระบบ *batch* โดยเครื่อง *spectrophotometer* แล้ว จึงนำสภาวะที่เหมาะสมนั้นมาทดสอบต่อระบบที่ใช้ในภาคสนาม (*portable-spectrometer*) และทดลองหาช่วงความเป็นเส้นตรงซ้ำเพื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นเส้นตรงและความชันของกราฟมาตรฐานระหว่างเครื่องมือทั้งสองชนิด ผลแสดงดังภาพที่ 4.16 จากการทดลองพบว่ากราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ *human serum albumin standard* และอัตราการดูดกลืนแสงมีค่าใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานในระบบ *batch* โดยให้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ $0-150 \text{ mg/L}$ ($r^2 = 0.995$) มีค่าความชันเท่ากับ -0.0471 ใกล้เคียงกับระบบ *batch* ที่มีค่าความชันเท่ากับ -0.0443 ถือได้ว่าไม่มีความแตกต่างด้านคุณสมบัติของการตรวจวิเคราะห์ระหว่างเครื่องมือทั้งสองชนิด จากนั้นจึงทำการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในผู้ป่วยเบาหวานจากโรงพยาบาลราชวิถีจำนวน 58 ราย เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตามขั้นตอนเดียวกับระบบ *batch* เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ *Bland and Altman plot* พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น ไม่มี *bias* ของการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากผลต่างระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปยังอยู่ในช่วง $\pm 1.96 \text{ SD}$ (ภาพที่ 4.17A) นอกจากนี้ยังได้มีการใช้สถิติ *Passing-bablok regression* (ภาพที่ 4.17B) พบว่าสมการ *Passing-bablok regression* คือ $y = 1.014x + 1.369$ ($y = ax + b$) และที่ช่วงค่าความเชื่อมั่น 95% จากกราฟพบว่าค่าความชันเท่ากับ 0.985 อยู่ในช่วง 0.965 ถึง 1.005 แสดงให้เห็นว่าสามารถยอมรับค่าความชันของสมการที่มีค่าไม่ต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ค่าจุดตัดแกน *y* มีค่าเท่ากับ 1.369 อยู่ในช่วง 0.577 ถึง 2.107



ภาพที่ 4.16 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนาม (portable-spectrometer) มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-150 mg/L ($r^2 = 0.995$)



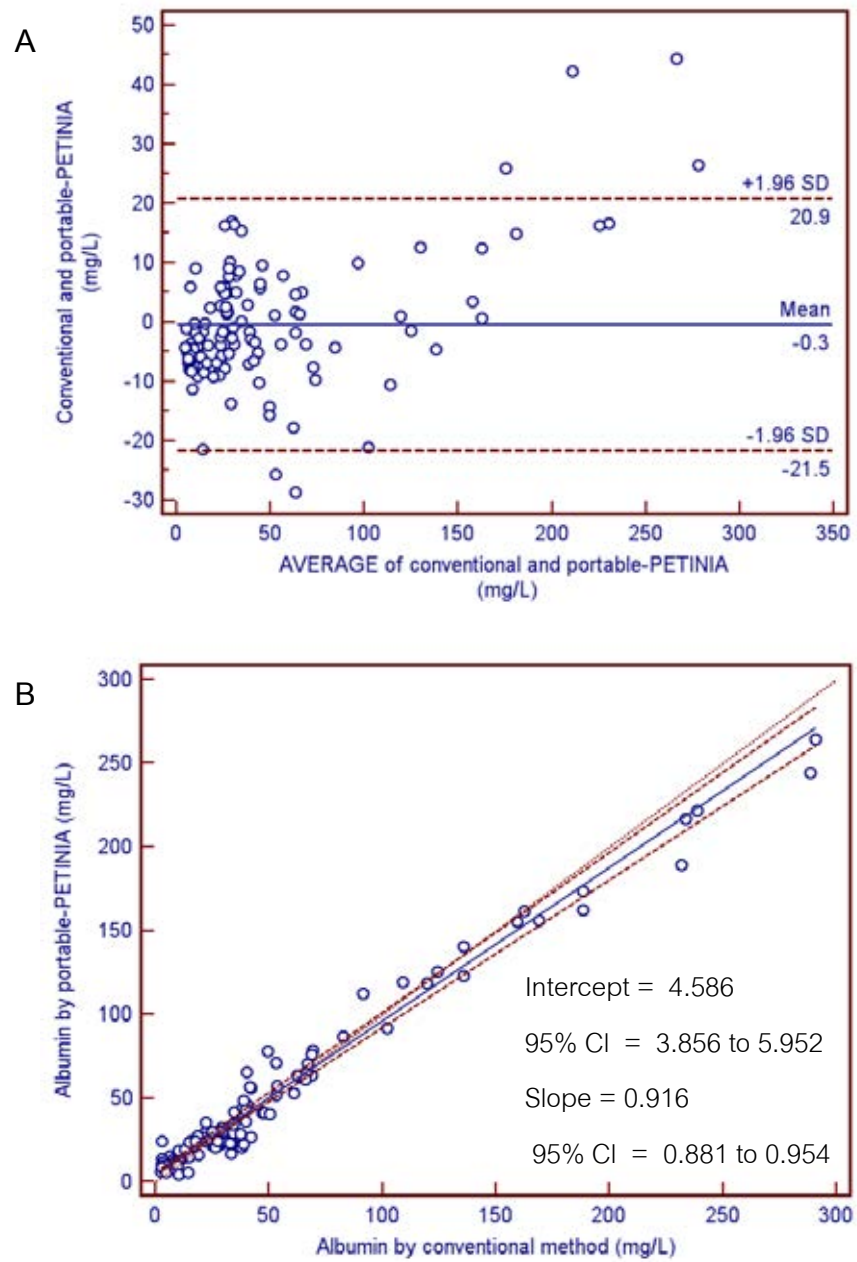
ภาพที่ 4.17 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนาม (portable-spectrometer) โดยใช้สถิติ Bland and Altman plot (A) และ Passing-bablok regression (B)

4.5.2 การทดลองในระดับภาคสนาม

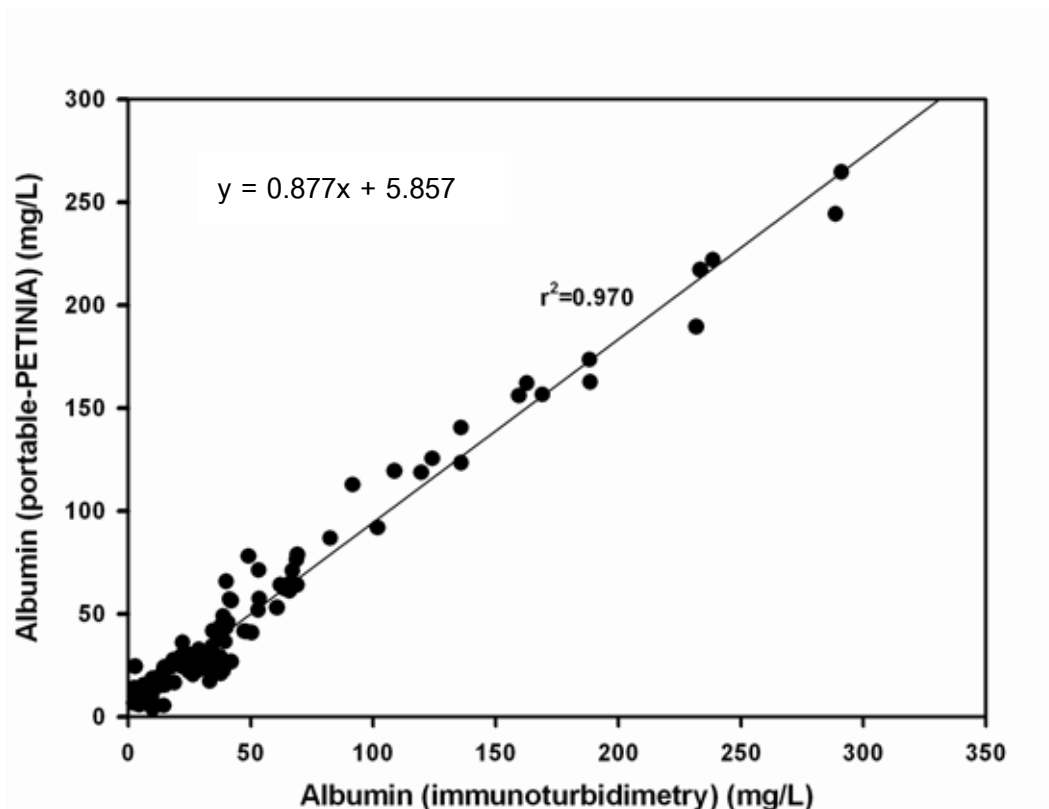
นำเครื่อง portable spectrometer และน้ำยาที่พัฒนาขึ้นไปตรวจวิเคราะห์บีสสภาวะจากผู้ป่วยโรคเบาหวาน ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลเขาขลุงและท่าผา อำเภอบ้านโป่งจังหวัดราชบุรี และโรงพยาบาลสมเด็จพระสังฆราชองค์ที่ 17 จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 120 คน เปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการภายนอกที่ใช้หลักการ

immunospectrometry ผลการตรวจทั้ง 2 วิธี เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Bland and Altman plot พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมี bias ของการตรวจวัดเพียงเล็กน้อย เนื่องจากส่วนใหญ่ผลต่างระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปยังอยู่ในช่วง ± 1.96 SD ในจำนวนสิ่งตัวอย่าง 120 รายที่ตรวจวัด มีจำนวน 4 รายที่วิธีในงานวิจัยนี้คำนวณได้ต่ำกว่าวิธีที่ใช้เปรียบเทียบและค่าผลต่างอยู่นอกช่วง 2 SD และมีจำนวน 2 รายที่วิธีในงานวิจัยนี้คำนวณได้สูงกว่าวิธีที่ใช้เปรียบเทียบและค่าผลต่างอยู่นอกช่วง 2 SD ซึ่งค่าที่ออกนอกช่วงทั้ง 6 รายนั้นคิดเป็น 5% ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจวัดทั้งหมด (ภาพที่ 4.18A) นอกจากนั้นยังได้มีการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Passing-bablok regression (ภาพที่ 4.18B) พบว่าสมการ Passing-bablok regression คือ $y = 0.916x + 4.586$ ($y = ax + b$) และที่ช่วงค่าความเชื่อมั่น 95% จากกราฟพบว่าค่าความชันเท่ากับ 0.916 อยู่ในช่วง 0.881 ถึง 0.954 และ ค่าจุดตัดแกน y มีค่าเท่ากับ 4.586 อยู่ในช่วงความเชื่อมั่นคือระหว่าง 3.856 ถึง 5.952 mg/L

เมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินด้วยเครื่อง portable spectrometer และน้ำยาที่พัฒนาขึ้น มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการ immunoturbidimetry โดยโปรแกรม Sigmaplot พบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่า $r^2 = 0.970$ ($n=120$) ดังในภาพที่ 4.19 แสดงให้เห็นว่าน้ำยาและระบบการตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกับวิธีที่ใช้ตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการทั่วไป



ภาพที่ 4.18 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินเมื่อทดสอบในระดับภาคสนาม โดยใช้สถิติ Bland and Altman plot (A) และ Passing-bablok regression (B)



ภาพที่ 4.19 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยน้ำยาและเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนามเทียบกับวิธี immunoturbidimetry ที่ตรวจด้วยเครื่อง Automated analyzer (n=120)

4.6 ผลทดสอบการเกิด hook effect จากการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการ PETINIA และ Immunoturbidimetric assays

เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจจับ hook effect ของหลักการ PETINIA จากปัสสาวะจำนวน 5 รายที่มีความเข้มข้นของอัลบูมินมากกว่า 1000 mg/L เปรียบเทียบกับการตรวจวัดด้วยหลักการ immunoturbidimetric assays พบว่าจากสิ่งตัวอย่างดังกล่าวเมื่อนำมาตรวจวัดด้วยหลักการ PETINIA โดยไม่ได้ทำการเจือจาง เบื้องต้นจะรายงานผลการตรวจวัดอัลบูมินมากกว่า 150 mg/L ซึ่งแสดงถึงค่าความเข้มข้นที่แท้จริงสูงกว่านี้เนื่องจากตรวจวัดได้ความเข้มข้นสูงเกินกว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด และสิ่งตัวอย่างดังกล่าวจำเป็นต้องเจือจางและนำไปตรวจวัดซ้ำเพื่อการรายงานผลที่ถูกต้องในลำดับต่อไป ในทางกลับกันถ้าสิ่งตัวอย่างดังกล่าวนำไปตรวจวัดปริมาณอัลบูมินโดยตรง โดยใช้หลักการ immunoturbidimetric assays ผลการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินอยู่ในช่วง 2-91.03 mg/L ซึ่งอยู่

ในช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดด้วยวิธีดังกล่าว ดังนั้นอาจทำให้รายงานค่าที่ต่ำกว่าความเป็นจริงได้ เมื่อนำปัสสาวะชุดเดียวกันมาเจือจางในอัตราส่วน 100-1000 เท่า ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ซ้ำ พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจวัดที่ใกล้เคียงกันโดยค่าอัลบูมินที่แท้จริงมีความเข้มข้นสูงมากในหลักกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าการตรวจระดับอัลบูมินในปัสสาวะด้วยหลักการ immunoturbidimetric assays มีโอกาสตรวจได้ผลลบปลอมสูง ซึ่งเป็นผลจาก hook effect กรณีที่ความเข้มข้นของอัลบูมินสูงมากๆ และวิธีนี้จำเป็นต้องมีขั้นตอนของ “prozone check” ก่อนเสมอ เช่นการใช้ protein test strip ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะก่อน ที่จะทำการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการเกิด hook effect จากการตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะระหว่างวิธี Immunoturbidimetric assays และวิธี PETINIA

ลำดับที่	ผลวิเคราะห์ก่อนเจือจาง (mg/L)		ผลวิเคราะห์หลังเจือจาง (mg/L)	
	Immunoturbidimetric assays	PETINIA	Immunoturbidimetric assays	PETINIA
1	2.6	198.9*	29,674.7	29,006.8
2	14.9	191.6*	5,620.0	5,991.0
3	30.0	184.1 *	2,373.9	2,570.4
4	83.8	183.0 *	1,280.7	1,244.5
5	91.0	167.5 *	1,036.2	1,133.2

* เป็นความเข้มข้นที่เกินช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีตรวจวัด ดังนั้นจำเป็นต้องเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ และตรวจวัดอีกครั้ง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเชิงปริมาณ ทางห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ นิยมใช้หลักการด้าน immunoassay เช่น immunoturbidimetric assays, particle enhanced agglutination assay และ immunonephelometric assays เป็นต้น เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง, เกิดปฏิกิริยารวดเร็ว และขั้นตอนการตรวจวัดไม่ยุ่งยาก (73, 141) แต่ข้อจำกัดของวิธีเหล่านี้คือต้องใช้เครื่องมือตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติที่มีขนาดใหญ่ เมื่อติดตั้งแล้วไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้อย่างสะดวก อีกทั้งหลักการตรวจวัดเชิงปริมาณใช้หลักการแบบ one-step immunometric assays หรือ homogenous immunoassay ซึ่งผลการตรวจวัดอาจมีผลลบปลอม (false negative results) ได้ในกรณีที่มีปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะมากเกินไป (antigen excess) หรือ hook effects ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี การเกิดผลลบปลอมสาเหตุเกิดจากการที่มีอัลบูมินปริมาณมากเกินไปจับกับแอนติบอดีในน้ำยา ทำให้ไม่เกิดการสานเป็นร่างแห จึงวัดการเกิดปฏิกิริยาได้ต่ำกว่าความเป็นจริง เป็นเหตุให้การรายงานผลทางห้องปฏิบัติการผิดพลาดได้ ทำให้ผู้ป่วยเสียโอกาสในการเข้ารับการรักษาต่อไป เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว เครื่องตรวจวิเคราะห์แบบอัตโนมัติของหลายบริษัท จึงได้เพิ่มขั้นตอนการตรวจเพื่อตรวจสอบการเกิด hook effects และจำเป็นต้องตรวจสอบกับตัวอย่างปัสสาวะทุกราย เช่น มีการเติมอัลบูมินความเข้มข้นสูงลงไปหลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้นเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงว่าแตกต่างจากเดิมหรือไม่ หรือจำเป็นต้องมีการเจือจางส่งตรวจอีกครั้งเทียบค่ากับก่อนการเจือจาง ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวทำให้สิ้นเปลืองน้ำยา แอนติบอดี และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา ส่งผลให้ต้นทุนราคาตรวจวิเคราะห์โดยรวมสูงขึ้นด้วย (142, 143)

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาน้ำยาและระบบการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการ particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) น้ำยาที่เตรียมและพัฒนาขึ้นมีความคงตัวและความไวเพียงพอสำหรับการตรวจวัดอัลบูมินปริมาณน้อยๆ ในระดับที่มีความสำคัญทางคลินิก สำหรับใช้วินิจฉัยระยะแรกของการเป็นโรคไตจากเบาหวานได้ และจากการใช้หลักการ PETINIA ทำให้ไม่เกิดผลลบปลอม ในกรณีที่มีอัลบูมินมากเกินไปจนเกิดการยับยั้งปฏิกิริยา ดังนั้นขั้นตอนของ “prozone check” หรือ “hook effect check” จึงไม่จำเป็น

ทำให้ประหยัดการใช้ยาน้ำยาและแอนติบอดีได้อย่างมาก และเนื่องจากมีขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์น้อย ทำให้วิธีนี้เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในภาคสนาม หรือใช้กับเครื่องมือวัดการดูดกลืนแสงแบบสั่งการด้วยมือ (manual) โดยในงานวิจัยนี้ ได้นำยาน้ำยาการตรวจวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเอง ไปประยุกต์ใช้ในระบบตรวจวัดเชิงแสง (optical detection) ที่อาศัยเส้นใยแก้วนำแสง (fiber optic) เป็นตัวเชื่อมต่อกับแหล่งกำเนิดแสง (light source) และตัวตรวจวัด (spectrometer detector) โดยรวมระบบมีขนาดเล็กสามารถพกพาไปใช้ในระดัภาคสนามได้สะดวก มีน้ำหนักเบา ประมาณ 2 กิโลกรัม และใช้พื้นที่น้อยในตั้งเครื่องมือดังกล่าว เหมาะสำหรับสถานบริการสาธารณสุขที่ห่างไกล และเป็นระบบตรวจวัดที่สามารถนำไปใช้ให้บริการเชิงรุก เพื่อค้นหาผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงที่อาจเป็นโรคไตจากเบาหวาน หรือสาเหตุจากโรคอื่นๆ เช่น ความดันโลหิตสูงได้

จากผลการวิจัยพบว่าการเตรียม albumin immobilized beads สำหรับใช้ในปฏิกิริยาเมื่อใช้เทคนิคการตรึงอนุภาคชนิด highly carboxylated polystyrene (COOH) beads ที่มีผิวเป็นประจุลบด้วย PEI ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ประจุบวกก่อน แล้วจึงทำการตรึงอัลบูมินให้อยู่บนผิว beads ซึ่งก่อนตรึงทำให้อัลบูมินมีประจุสุทธิเป็นลบก่อน โดยละลายในบัฟเฟอร์ที่มี pH มากกว่าค่า pI ของมัน (human serum albumin มีค่า pI 4.7) ในการทดลองเลือกใช้ pH 7.4 ปริมาณ BPEI ที่ใช้ตรึงมีผลต่อการเกาะกลุ่มของ beads ในงานวิจัยนี้ปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.005 mg/mL และปริมาณอัลบูมินที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้คือ ความเข้มข้น 0.548 mg/mL ต่อ beads เริ่มต้น 4 mg ซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้คิดเป็น 4 เท่าของความเข้มข้นอัลบูมินที่ตรึงเป็นชั้นเดียวบนผิวของอนุภาค (monolayer) โดยพบว่าการตรึง beads ด้วยเทคนิคนี้ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโปรตีนกับพื้นผิว beads ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการตรึง beads 6 ครั้งต่างเวลากัน ให้ผลการตรึงโปรตีนเฉลี่ย (% yield) สูงเฉลี่ยถึงร้อยละ 94.66 ประสิทธิภาพของการตรึงโปรตีนแต่ละครั้งได้ดี เนื่องจากการที่มีการใช้ BPEI ปริมาณที่เหมาะสม เข้าจับกับ functional groups บนผิว beads อย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ เมื่อใส่สารละลาย human serum albumin ที่ทำให้มีประจุลบในปริมาณที่เหมาะสมลงไปจึงเข้าไปจับกับ BPEI บนผิว beads ด้วยทิศทางที่เหมาะสมเท่าๆ กัน ทำให้ลดการหลุดลอกของโปรตีนขณะ incubate และในขั้นตอนการปั่นล้างส่วนเกินออก และได้สารละลาย beads ที่เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ไม่เกาะกลุ่มหรือตกตะกอน ผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพของ immobilized beads โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ปรากฏเงาสีเทาที่เกิดจากชั้นของโปรตีนล้อมรอบ immobilized beads อย่างชัดเจนต่างจาก beads ที่ไม่ผ่านการตรึง human serum albumin

การตรึงด้วยการใช้ BPEI บนผิวของ beads ที่มีประจุลบ นี้ช่วยลดช่องว่างระหว่างโมเลกุล, ลด non-specific adsorption จากโมเลกุลอื่นๆ และทำให้การตรึงโปรตีนบน beads มีความแข็งแรงมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Schwartz และคณะ (108) ที่ได้นำ BPEI มาเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงโปรตีนบน solid supports แบบต่างๆ เช่น microplate, test tube และ beads เป็นต้น ความคงตัวของ beads ที่ตรึงด้วยเทคนิคนี้ จากผลการทดลองพบว่าอายุการใช้งานอย่างน้อย 6 เดือน ซึ่งมีความคงตัวมากกว่าการตรึงโปรตีนโดยวิธี passive adsorption ที่ใช้แรงจับกันอย่างอ่อน เช่น hydrophobic interaction และแรง Van der Waals ซึ่ง immobilized particles มีอายุการใช้งานโดยเฉลี่ยไม่เกิน 4 เดือน (104) นอกจากนี้ ในขั้นตอนการตรึงโปรตีนบน beads โดยผ่านการใช้ BPEI นั้นไม่จำเป็นต้องใช้ cross-linking reagent เหมือนการตรึงด้วยพันธะ covalent (104, 144, 145) ทำให้สามารถลดขั้นตอนและการใช้สารเคมีได้อย่างมาก

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทาง immunoassay ควรจะมี pH และ ionic strength อยู่ในช่วงสมดุลใกล้เคียงกับสารน้ำในร่างกายมนุษย์มากที่สุด องค์ประกอบของน้ำยาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมินด้วยหลักการ PETINIA ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 ที่มี NaCl 200 mM และ 4% PEG เป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีเท่ากับ 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ บัฟเฟอร์ชนิด potassium phosphate เตรียมได้ง่าย มีราคาถูกและใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถเตรียมให้มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.5-7.5 ได้ ปริมาณ NaCl 200 mM ที่เติมลงไปใกล้เคียงกับ physiological saline จึงช่วยรักษาคุณสมบัติของแอนติเจนหรือแอนติบอดีในปฏิกิริยา ปริมาณ 4% PEG ที่เติมลงไปในบัฟเฟอร์เป็นปริมาณที่พอเหมาะไม่น้อยหรือมากเกินไปจนเกิดความหนืดทำให้ขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้น นอกจากนี้ PEG ยังช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาและคงสภาพการเกิดปฏิกิริยาแบบ particle enhance immunoassay ให้คงที่ ง่ายต่อการวัดปฏิกิริยา ปริมาณที่ใช้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Spencer (146) และ Bakker (140) ที่เติม 4% และ 4.5% PEG ตามลำดับ ลงใน potassium phosphate buffer, pH 7.4 เพื่อเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาแบบ immunoturbidimetry

ปริมาณสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างความเข้มข้นของแอนติเจนและโพลีโคลนัลแอนติบอดีในปฏิกิริยาขั้นตอนแรก มีผลต่อความไวและช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวิเคราะห์ ปริมาณโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมทำให้เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มอย่างสมบูรณ์และไม่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ rabbit anti-human albumin antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิด

IgG มีคุณสมบัติเกิดปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนได้ดีเนื่องจากมี antigen binding site 2 ด้าน จากผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยา พบว่าความเข้มข้นของโพลีโคลนัลแอนติบอดีเท่ากับ 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ดีที่สุด เมื่อคำนวณในด้านต้นทุนราคาแอนติบอดีที่ใช้ต่อหนึ่ง reaction แล้วพบว่ามียาเพียง 16.25 บาทเท่านั้น นอกจากนี้เมื่อรวมกับราคาของ beads (1.22 บาท/test), human serum albumin (6 บาท/test) และสารเคมีอื่นๆ ที่สามารถใช้ได้ในระยะยาวแล้วพบว่าต้นทุนราคาน้ำยาทั้งหมดไม่เกิน 40 บาท เปรียบเทียบกับราคาตรวจวิเคราะห์ไมโครอัลบูมินของสถานบริการสาธารณสุขในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2547 ตามราคาของกรมบัญชีกลาง การตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ คิดอัตรา 270 บาท ต่อราย ซึ่งราคาสูงกว่าวิธีที่นำเสนอในงานวิจัยนี้ถึง 6-7 เท่า ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นมีต้นทุนการตรวจวัดต่ำ เหมาะสมสำหรับใช้ภายในประเทศ เพื่อทดแทนการนำเข้าชุดน้ำยาจากต่างประเทศได้ทางหนึ่ง

โดยทั่วไปปฏิกิริยาแอนติเจนกับแอนติบอดีที่เกิดการสานกันเป็นร่างแหจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C เนื่องจากที่อุณหภูมิดังกล่าวจะมีค่า association constant (K) ลดลง ทำให้การจับกลุ่มระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีรวดเร็วและคงที่มากที่สุด (101) เนื่องจากวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิช่วง 25°C- 37°C ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยามากนัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Spencer และคณะ (146) อาจเนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนที่นำมาใช้มีความคงทนต่ออุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลง จึงยังคงรักษาอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาอย่างคงที่ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40°C และ 42 °C อัตราการดูดกลืนแสงของ standard มีค่าสูงขึ้นเล็กน้อย ในงานวิจัยนี้จึงเลือกวัดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการวัดปฏิกิริยา immunoassay และเครื่องมือเกือบทุกชนิดมีการติดตั้งให้ปรับอุณหภูมินี้ได้ ทำให้การนำน้ำยาที่พัฒนาในงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

งานวิจัยนี้เลือกใช้ความยาวคลื่น 510 nm ในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มระหว่าง immobilized beads ขนาด 0.51 μm กับโพลีโคลนัลแอนติบอดี ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.9-1.0 แต่ในช่วงความยาวคลื่นที่น้อยกว่า 500 nm ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นให้ค่าการดูดกลืนแสงค่อนข้างสูงคือมีค่าอยู่ในช่วง 1.0-1.5 ซึ่งอาจทำให้เกิดสัญญาณรบกวนการตรวจวัดที่ใช้หลักการเชิงแสงได้ ส่วนที่ความยาวคลื่นมากกว่า 510 nm เป็นต้นไปให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเรื่อยๆ

ทำให้วัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้น้อยลง สอดคล้องกับกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Lucas และคณะ (147) ที่ใช้ immobilized beads ขนาด 0.51 μm ทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับ anti-PR3 ใน plasma ซึ่งเป็น vasculitis marker ทำนายความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดอักเสบแล้ววัดการกระเจิงของแสง (light scattering) ที่ความยาวคลื่น 510 nm เช่นเดียวกัน นอกจากนั้นการเลือกใช้ความยาวคลื่นที่อยู่ในช่วง visible light ยังง่ายต่อการเลือกใช้แหล่งกำเนิดแสง (light source) เนื่องจากเป็นช่วงแสงที่ใช้ในการวัดปฏิกิริยาทาง immunoassay ทั่วไป และเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ทั่วไปมีแหล่งกำเนิดแสงช่วงนี้ เนื่องจากมีราคาไม่แพง มีอายุการใช้งานนาน

ในงานวิจัยนี้ มีขั้นตอนการตรวจวัด ขั้นแรกให้แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับอัลบูมินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นหรืออัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะก่อนเป็นเวลา 2 นาทีที่ 37°C จากนั้นจึงเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม albumin immobilized beads ลงไปแย่งจับโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่หลุดจาก antigen - antibody complexes ในขั้นตอนแรก และวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น ที่ความยาวคลื่น 510 nm เป็นเวลา 2 นาที ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างจะใช้เวลาทั้งสิ้น 4 นาที ซึ่งนับว่าวิธีนี้ใช้ระยะเวลาในการตรวจวัดน้อยเมื่อเทียบกับวิธีด้าน immunoassay อื่นๆ ที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการซึ่งใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 30 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่างขึ้นไป (73, 75, 76) อย่างไรก็ดีตาม วิธีการตรวจวัดและเครื่องมือในงานวิจัยนี้ ยังมีข้อจำกัดคือสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทีละตัวอย่างเท่านั้น ดังนั้นในกรณีที่จำนวนตัวอย่างมีปริมาณมากอาจทำให้ระยะเวลาการรายงานผลนานกว่าระบบการตรวจวิเคราะห์แบบ batch ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างต่อเนื่องที่หลายตัวอย่าง แต่ด้วยคุณสมบัติของหลักการการตรวจวัดและความคงตัวของน้ำยา จึงมีศักยภาพสูงที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Automated analyzer machine) ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วไปได้

ผลการศึกษาคุณสมบัติของวิธีที่พัฒนาขึ้น มีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดไมโครอัลบูมินระหว่าง 0-150 mg/L ($r^2 = 0.996$) ค่าต่ำสุดของวิธีที่ตรวจวัดได้คือ 7.14 mg/L ซึ่งครอบคลุมการวินิจฉัยในคนปกติและผู้ที่มีภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยไม่ต้องเจาะจางส่งตรวจ ทำให้ลดข้อผิดพลาดจากขั้นตอนการเจาะจางเนื่องจาก pipetting error ได้ อย่างไรก็ตามช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ยังแคบกว่างานวิจัยของ Thakkar และคณะ (148) ที่ตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินด้วยเครื่อง Dade aca® analyzer โดยใช้หลักการเดียวกันให้ช่วงกว้างถึง 2-250 mg/L ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 0.4 mg/L อาจเนื่องจากขนาดของ beads ที่ใช้ใน

ปฏิกิริยามีขนาดเล็กกว่า (40 nm) พื้นที่ผิวในการทำปฏิกิริยาจึงมากกว่าทำให้ความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงกว่า และวิธีดังกล่าวยังใช้แอนติบอดีปริมาณมากกว่า ต่อการทดสอบใช้แอนติบอดี 20 µg แต่วิธี PETINIA ในงานวิจัยนี้ใช้เพียง 13 µg ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยกว่าจึงทำให้มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่แคบกว่าเล็กน้อย นอกจากนี้การพัฒนาคูณน้ำยาในรูปแบบอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีของเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์เป็นปัจจัยสำคัญของความแตกต่างด้านคุณสมบัติในการตรวจวัดดังกล่าว โดยสรุปเมื่อเปรียบเทียบช่วงความเป็นเส้นตรงการตรวจวัดไมโครอัลบูมินด้วยหลักการทั่วไปในห้องปฏิบัติการ เช่น immunoturbidimetry (79, 140) และ particle enhanced immunoassay (28, 95) อยู่ในช่วง 2-260 mg/L ค่าต่ำสุดที่วัดได้เท่ากับ 2 mg/L ดังนั้นน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือและความไวเพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ไมโครอัลบูมินในปัสสาวะได้และครอบคลุมระยะที่มีความสำคัญทางคลินิก

การทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยาตรวจวัดพบว่า urea, creatinine, gamma globulin, NaCl, hemoglobin, ampicilin, ascorbic acid, glucose และ bilirubin ไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญโดยมี % Recovery อยู่ในช่วง 95-102.6 % ส่วน uric acid และ KCL ที่ความเข้มข้นสูง 500 mg/L และ 5000 mg/L ตามลำดับ รบกวนการตรวจวัดไมโครอัลบูมินเพียงเล็กน้อยโดยมี % Recovery เท่ากับ 105.8 % ค่า % Recovery ที่ยอมรับได้ว่าสารที่นำมาทดสอบไม่รบกวนการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญควรอยู่ในช่วง 95-105 %

ผลการทดสอบทดสอบหาค่าความเที่ยงตรงของการตรวจวัดพบว่า %CV ของการวิเคราะห์แบบ intra-assay (n=40) คือ 7.2% และ 2.2% เมื่อวิเคราะห์ microalbumin liquid controls ความเข้มข้นเท่ากับ 38.3 และ 153.4 mg/L ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์แบบ inter-assay เป็นเวลา 20 วันต่อเนื่อง สำหรับตรวจวัด microalbumin liquid controls ความเข้มข้น 2 ระดับที่ 30.4 และ 132.9 mg/L (n=40) มี %CV เท่ากับ 9.5% และ 3.1% ตามลำดับ

Immobilized beads มีความคงตัวในการเกิดปฏิกิริยาอย่างน้อย 6 เดือน โดยเมื่อนำ beads ที่เก็บไว้มาตรวจวัดอัลบูมินมาตรฐานความเข้มข้น 0 และ 75 mg/L เป็นระยะๆ พบว่ามีค่าเฉลี่ยของอัตราการดูดกลืนแสงของความเข้มข้น 0 และ 75 mg/L เป็น 0.0717 และ 0.0285 และมีค่า %CV อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 1.51% และ 1.26% ตามลำดับ และการเตรียม immobilized beads สำหรับเก็บเป็น stock beads solution พบว่าจากการเตรียมจำนวน 6 ครั้ง

ต่างวันและเวลา เมื่อนำมาทดสอบปฏิกิริยากับสารควบคุมมาตรฐาน 2 ระดับ พบว่าผลการตรวจวัดอยู่ในช่วงที่กำหนดทั้ง 2 ระดับทุกครั้ง และมีค่าเฉลี่ยของการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินเท่ากับ 35.14 mg/L (8.24 %CV) และ 146.12 mg/L (8.86 %CV) แสดงให้เห็นว่าการเตรียม beads สำหรับใช้เป็นน้ำยาในการตรวจวัดมีความแม่นยำสูง เมื่อเตรียมแต่ครั้งให้ประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน

ผลการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยน้ำยาและวิธีที่พัฒนาขึ้นในระดับภาคสนาม เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ที่ใช้หลักการ immunoturbidimetry โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 120 คน โดยใช้สถิติ Bland and Altman plot พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมี bias ของการตรวจวัดเพียงเล็กน้อยคิดเป็น 5% เนื่องจากส่วนใหญ่ผลต่างระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปยังอยู่ในช่วง ± 1.96 SD จากสิ่งตัวอย่าง 4 ราย มีผลการตรวจวัดแล้วพบว่าผลต่างของวิธีทั้งสอง อยู่นอกช่วง 1.96 SD โดยวิธีในงานวิจัยนี้ตรวจวัดได้น้อยกว่าวิธี immunoturbidimetry เป็นช่วงความเข้มข้นที่สูงเกิน upper linear range (> 150 mg/L) ดังนั้นจึงอาจมีความคลาดเคลื่อนจากการเจือจางตัวอย่างปัสสาวะ ทำให้ผลต่างของวิธีมี bias เล็กน้อย และมี 2 รายที่วิธี PETINIA ตรวจวัดได้สูงกว่าวิธี immunoturbidimetry ซึ่งถือว่าเป็นผลเสียต่อผู้ป่วยอย่างไร เพราะค่าที่สูงเกินกว่าค่าปกติเล็กน้อยนี้ ไม่ทำให้ผู้ป่วยเสียโอกาสในการเข้ารับการตรวจวัดภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะซ้ำอีก เพราะแนวทางการตรวจเพื่อยืนยันภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ระบุว่าควรมีการตรวจซ้ำและให้ผลบวกอย่างน้อย 2 ใน 3 ครั้ง ภายในระยะเวลา 6 เดือน นอกจากนั้นยังได้มีการใช้สถิติ Passing-bablok regression พบว่าค่าความชันเท่ากับ 0.916 ซึ่งมีค่าไม่ต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอยู่ในช่วง 0.881 ถึง 0.954 ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% และ ค่าจุดตัดแกน y มีค่าเท่ากับ 4.586 อยู่ในช่วง 3.856 ถึง 5.952 อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์สถิติ linear regression พบว่าการตรวจวัดทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กัน ($r^2 = 0.970$) จึงสรุปได้ว่าน้ำยาและระบบการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ สำหรับใช้ในภาคสนามนี้ให้ผลการตรวจวัดที่ค่อนข้างมีความถูกต้องสอดคล้องกับวิธีที่ใช้ตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการทั่วไป

โดยสรุป จากงานวิจัยครั้งนี้ น้ำยาที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ รวมถึงระบบตรวจวัดที่คณะผู้วิจัยได้ออกแบบสำหรับการนำไปใช้ในภาคสนามนั้น สามารถตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในเชิงปริมาณได้อย่างมีความไว ความจำเพาะสูง และยังมีมีความแม่นยำในการ

ตรวจวัด ดังนั้นจึงมีศักยภาพสูงสำหรับนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยโรคการเป็นโรคไตจากเบาหวานได้ตั้งแต่ระยะแรก และเป็นผลดีต่อผู้ป่วยเนื่องจากการตรวจพบไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเป็นระยะที่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้นจึงเป็นการป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนทางไตในผู้ป่วยเบาหวานซึ่งมีจำนวนมากในประเทศ และระบบการตรวจวัดที่มีขนาดเล็ก กะทัดรัด สามารถพกพาไปใช้ในภาคสนามได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากกับสถานบริการสาธารณสุขที่ห่างไกล เป็นการยกระดับการรักษาสุขภาพในผู้ป่วยโรคเบาหวานและกลุ่มเสี่ยงอื่นๆ ได้รับบริการทางสาธารณสุขอย่างเท่าเทียมกัน

รายการอ้างอิง

- [1] Rydén L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, De Boer MJ, et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. European Heart Journal 28 (2007): 88.
- [2] Mogensen CE. Microalbuminuria, renal disease, metabolic syndrome and risks in diabetes. Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews 1 (2007): 127-33.
- [3] Tebbe U, Bramlage P, Thoenes M, Paar W, Danchin N, Volpe M, et al. Prevalence of microalbuminuria and its associated cardiovascular risk: German and Swiss results of the recent global i-SEARCH survey. Swiss Medical Weekly 22 (2009): 473-80.
- [4] Bigazzi R, Bianchi S, Baldari D, Campese V. Microalbuminuria predicts cardiovascular events and renal insufficiency in patients with essential hypertension. Journal of Hypertension 16 (1998): 1325.
- [5] Mohan V, Venkatraman J, Pradeepa R. Epidemiology of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: The Indian Scenario. Journal of Diabetes Science and Technology 4 (2010): 158.
- [6] Amos A, McCarty D, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. Diabetic Medicine 14 (1997): S7-S85.
- [7] Chen B, Yang D, Chen Y, Xu W, Ye B, Ni Z. The prevalence of microalbuminuria and its relationships with the components of metabolic syndrome in the general population of China. Clinica Chimica Acta 411 (2010): 705-9.
- [8] Riewpaiboon A, Pornlertwadee P, Pongsawat K. Diabetes cost model of a hospital in Thailand. Value in Health 10 (2007): 223-30.
- [9] Gabir M, Hanson R, Dabelea D, Imperatore G, Roumain J, Bennett P, et al. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria

for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. Diabetes care 23 (2000): 1108.

- [10] Foundation NK. National Kidney Foundation.(2010).
- [11] Fact ND. American Diabetes Association.(2007).
- [12] Hoseini V, Rasouli M. Microalbuminuria correlates with the prevalence and severity of coronary artery disease in non-diabetic patients. Cardiology Journal (dawniej Folia Cardiologica) 16 (2009): 142-5.
- [13] Messent J, Elliott T, Hill R, Jarrett R, Keen H, Viberti G. Prognostic significance of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus: a twenty-three year follow-up study. Kidney International Journal 41 (1992): 836-9.
- [14] Park H, Schumock G, Pickard A, Akhras K. A structured review of the relationship between microalbuminuria and cardiovascular events in patients with diabetes mellitus and hypertension. Pharmacotherapy 23 (2003): 1611-6.
- [15] American Diabetes Association clinical practice recommendations 2007. Diabetes Care 2007 30 (2007): Suppl: S4-41.
- [16] de Jong P, Gansevoort R. Focus on microalbuminuria to improve cardiac and renal protection. Nephron Clinical Practice 111 (2009): c204-c11.
- [17] Marshall S, Shearing P, Alberti K. Micral-test strips evaluated for screening for albuminuria. Clinical Chemistry 38 (1992): 588.
- [18] Parikh CR, Fischer MJ, Estacio R, Schrier RW. Rapid microalbuminuria screening in type 2 diabetes mellitus: simplified approach with Micral test strips and specific gravity. Nephrology Dialysis Transplantation 19 (2004): 1881.
- [19] Townsend J. Increased albumin excretion in diabetes. British Medical Journal 43 (1990): 3.
- [20] Butch AW. Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon. Clinical Chemistry 46 (2000): 1719.
- [21] Stanley J. Essentials of Immunology & Serology NY, USA: DELMAR, THOMSON LEARNING; 2002.

- [22] Bhagat A, Papautsky I. Enhancing particle dispersion in a passive planar micromixer using rectangular obstacles. Journal of Micromechanics and Microengineering 18 (2008): 085005.
- [23] Jury D, Mikkelsen D, Dunn P. Prozone effect and the immunoturbidimetric measurement of albumin in urine. Clinical Chemistry 36 (1990): 1518.
- [24] Wu TL, Chang PY, Li CC, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Microplate ELISA for urine microalbumin: reference values and results in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease. Annals of Clinical & Laboratory Science 35 (2005): 149.
- [25] Aybay C, Karakus R. Measurement of urine albumin levels with a monoclonal antibody based in-house ELISA. Turkish Journal of Medical Sciences 33 (2003): 1-6.
- [26] Mancini G, Carbonara A, Heremans J. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2 (1965): 235-54, IN5-IN6.
- [27] Woo J, Floyd M, Cannon DC, Kahan B. Radioimmunoassay for urinary albumin. Clinical Chemistry 24 (1978): 1464.
- [28] Cambiaso C, Collet-Cassart D, Lievens M. Immunoassay of low concentrations of albumin in urine by latex particle counting. Clinical Chemistry 34 (1988): 416.
- [29] Turpeinen U, Koivunen E, Stenman U. Liquid-chromatographic determination of beta 2-microglobulin, alpha 1-acid glycoprotein, and albumin in urine. Clinical Chemistry 33 (1987): 1756.
- [30] Vesterberg O. Quantification of albumin in urine by a new method: zone immunoelectrophoresis assay (ZIA). Clinica Chimica Acta 113 (1981): 305-10.
- [31] Stanley J, editor. Essentials of Immunology and serology.
- [32] Price CP TA, Berry D, Gorman EG. Development and validation of a particle - enhance turbidimetric immunoassay for C-reactive protein Journal of Immunological Methods 99 (1987).

- [33] Thakkar H, Newman DJ, Holownia P, Davey CL, Wang CC, Lloyd J, et al. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric inhibition assay for urine albumin on the Dade aca (R) analyzer. Clinical Chemistry 43 (1997): 109.
- [34] Boden G, Watson R. Free fatty acids: role in insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. Fatty Acids in Health Promotion and Disease Causation (2009): 221-33.
- [35] Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. Autoimmunity Reviews 7 (2008): 550-7.
- [36] Skyler J. Immune intervention for type 1 diabetes mellitus. International Journal of Clinical Practice 65 (2011): 61-70.
- [37] Hakonarson H, Grant SFA, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. Nature 448 (2007): 591-4.
- [38] Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type [thinsp] 1 diabetes. Nature 464 (2010): 1293-300.
- [39] Wolfsdorf J, Glaser N, Sperling MA. Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents. Diabetes Care 29 (2006): 1150.
- [40] Crandall JP, Knowler WC, Kahn SE, Marrero D, Florez JC, Bray GA, et al. The prevention of type 2 diabetes. Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism 4 (2008): 382-93.
- [41] Aekplakorn W, Stolk RP, Neal B, Suriyawongpaisal P, Chongsuvivatwong V, Cheepudomwit S, et al. The prevalence and management of diabetes in Thai adults. Diabetes Care 26 (2003): 2758.
- [42] Nitiyanant W, Chetthakul T, Sang-A-kad P, Therakiatkumjorn C, Kunsuikmengrai K, Yeo JP. A survey study on diabetes management and complication status in primary care setting in Thailand. Journal-Medical Association of Thailand 90 (2007): 65.

- [43] Supornsilpchai C, Mahabhol NC, Mookdadilok O. เบาหวาน ใน ไทย: บทเรียน จาก นโยบาย ของ ประเทศ พัฒนา. (2008).
- [44] Molitch ME, Defronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving H, et al. Nephropathy in diabetes. Diabetes Care 27 (2004): S79.
- [45] Mogensen C, Christensen C, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. Diabetes 32 (1983): 64.
- [46] Nephrology. IDFaiSo. Diabetes and Kidney Disease:Time to Act. (2003).
- [47] Leelawattana R, Pratipanawatr T, Bunnag P, Kosachunhanun N, Suwanwalaikorn S, Krittiyawong S, et al. Thailand diabetes registry project: prevalence of vascular complications in long-standing type 2 diabetes. Journal of The Medical Association of Thailand 89 (2006): S54-9.
- [48] Devji T, Prebtani APH. Test your knowledge on.
- [49] Scandling J, Myers B. Glomerular size-selectivity and microalbuminuria in early diabetic glomerular disease. Kidney International Journal 41 (1992): 840-6.
- [50] Tamsma J, Van den Born J, Bruijn J, Assmann K, Weening J, Berden J, et al. Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: decrease of heparan sulphate in the glomerular basement membrane. Diabetologia 37 (1994): 313-20.
- [51] Bakris G, Kuritzky L. Monitoring and managing urinary albumin excretion: practical advice for primary care clinicians. Postgraduate Medicine 121 (2009): 51.
- [52] Klausen K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen G, Clausen P, Scharling H, et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. Circulation 110 (2004): 32.
- [53] Nelson R, Bennett P, Beck G, Tan M, Knowler W, Mitch W, et al. Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. New England Journal of Medicine 335 (1996): 1636.

- [54] de Zeeuw D, Remuzzi G, Parving H, Keane W, Zhang Z, Shahinfar S, et al. Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL. Kidney International 65 (2004): 2309-20.
- [55] Agodoa L, Appel L, Bakris G, Beck G, Bourgoignie J, Briggs J, et al. Effect of ramipril vs amlodipine on renal outcomes in hypertensive nephrosclerosis: a randomized controlled trial. Jama 285 (2001): 2719.
- [56] Jafar T, Stark P, Schmid C, Landa M, Maschio G, de Jong P, et al. Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. Annals of Internal Medicine 139 (2003): 244.
- [57] Ruggenenti P, Perna A, Remuzzi G. Retarding progression of chronic renal disease: the neglected issue of residual proteinuria. Kidney International 63 (2003): 2254-61.
- [58] Miller W, Bruns D, Hortin G, Sandberg S, Aakre K, McQueen M, et al. Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. Clinical Chemistry 55 (2009): 24.
- [59] Hemmelgarn B, Manns B, Lloyd A, James M, Klarenbach S, Quinn R, et al. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. Jama 303 (2010): 423.
- [60] Jensen JS, Clausen P, Borch-Johnsen K, Jensen G, Feldt-Rasmussen B. Detecting microalbuminuria by urinary albumin/creatinine concentration ratio. Nephrology Dialysis Transplantation 12 (1997): 6-9.
- [61] James M, Fotherby M, Potter J. Screening tests for microalbuminuria in non-diabetic elderly subjects and their relation to blood pressure. Clinical Science (London, England: 1979) 88 (1995): 185.
- [62] Derhaschnig U, Kittler H, Woisetschläger C, Bur A, Herkner H, Hirschl MM. Microalbumin measurement alone or calculation of the albumin/creatinine ratio for the screening of hypertension patients? Nephrology Dialysis Transplantation 17 (2002): 81.

- [63] Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, Hebert L, Levey AS, Parving HH, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). American Journal of Kidney Diseases: the official journal of the National Kidney Foundation 42 (2003): 617.
- [64] Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. Diabetes Care 28 (2005): 164.
- [65] Hutchison A, O'Reilly D, MacCuish A. Albumin excretion rate, albumin concentration, and albumin/creatinine ratio compared for screening diabetics for slight albuminuria. Clinical Chemistry 34 (1988): 2019.
- [66] Imed H, Wided S, Fethi H, Monder O, Ezzeddine A, Hafedh H, et al. Cardiovascular risk factors in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation (2010): 739-745.
- [67] Okura T, Kurata M, Irita J, Enomoto D, Jotoku M, Nagao T, et al. Renal resistance index is a marker of future renal dysfunction in patients with essential hypertension. Journal of Nephrology (2010).
- [68] Mathew T, Corso O, Ludlow M, Boyle A, Cass A, Chadban S, et al. Screening for chronic kidney disease in Australia: a pilot study in the community and workplace. Kidney International 77 (2010): S9-S16.
- [69] Cesarone M, Belcaro G, Stuard S, Sch niau F, Di Renzo A, Grossi M, et al. Kidney Flow and Function in Hypertension: Protective Effects of Pycnogenol in Hypertensive Participants—A Controlled Study. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics 15 (2010): 41.
- [70] Viazzi F, Leoncini G, Conti N, Tomolillo C, Giachero G, Vercelli M, et al. Combined effect of albuminuria and estimated glomerular filtration rate on cardiovascular events and all-cause mortality in uncomplicated hypertensive patients. Journal of Hypertension 28 (2010): 848.

- [71] Shantha G, Kumar A, Bhaskar E, Sivagnanam K, Srinivasan D, Sundaresan M, et al. Hypertensive retinal changes, a screening tool to predict microalbuminuria in hypertensive patients: a cross-sectional study. Nephrology Dialysis Transplantation 25 (2010): 1839.
- [72] Keen H, Chlouverakis C. An immunoassay method for urinary albumin at low concentrations. Lancet 2 (1963): 913.
- [73] Tiu SC, Lee SS, Cheng MW. Comparison of six commercial techniques in the measurement of microalbuminuria in diabetic patients. Diabetes Care 16 (1993): 616.
- [74] Watts G, Bennett J, Rowe D, Morris R, Gatling W, Shaw K, et al. Assessment of immunochemical methods for determining low concentrations of albumin in urine. Clinical Chemistry 32 (1986): 1544.
- [75] Lizana J, Hellsing K. Manual immunonephelometric assay of proteins, with use of polymer enhancement. Clinical Chemistry 20 (1974): 1181.
- [76] Townsend J. A competitive immunoenzymometric assay for albumin in urine. Clinical Chemistry 32 (1986): 1372.
- [77] Kricka LJ, Carter T, Burt S, Kennedy J, Holder R, Halliday M, et al. Variability in the adsorption properties of microtitre plates used as solid supports in enzyme immunoassay. Clinical Chemistry 26 (1980): 741.
- [78] Bernard A, Lauwerys R. Latex immunoassay of urinary albumin. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 21 (1983): 25-30.
- [79] Kearney E, Mount J, Watts G, Slavin B, Kind P. Simple immunoturbidimetric method for determining urinary albumin at low concentrations using Cobas-Bio centrifugal analyser. Journal of Clinical Pathology 40 (1987): 465.
- [80] Choi S, Choi EY, Kim HS, Oh SW. On-site quantification of human urinary albumin by a fluorescence immunoassay. Clinical Chemistry 50 (2004): 1052.
- [81] Liang AH, Huang YJ, Jiang ZL. A rapid and sensitive immunoresonance scattering spectral assay for microalbumin. Clinica Chimica Acta 383 (2007): 73-7.

- [82] Contois JH, Hartigan C, Rao LV, Snyder LM, Thompson MJ. Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin. Clinica Chimica Acta 367 (2006): 150-5.
- [83] Chan O, Herold DA. Chip electrophoresis as a method for quantifying total microalbuminuria. Clinical Chemistry 52 (2006): 2141.
- [84] Navrátilová I, Skládal P, Víklický V. Development of piezoelectric immunosensors for measurement of albuminuria. Talanta 55 (2001): 831-9.
- [85] Frost S, Chakraborty J, Firth G. Urinary microalbumin measurement using a homogeneous liposomal immunoassay. Journal of Immunological Methods 194 (1996): 105-11.
- [86] Lu M, Ibraimi F, Kriz D, Kriz K. A combination of magnetic permeability detection with nanometer-scaled superparamagnetic tracer and its application for one-step detection of human urinary albumin in undiluted urine. Biosensors and Bioelectronics 21 (2006): 2248-54.
- [87] Luo Y, Chen M, Wen Q, Zhao M, Zhang B, Li X, et al. Rapid and simultaneous quantification of 4 urinary proteins by piezoelectric quartz crystal microbalance immunosensor array. Clinical Chemistry 52 (2006): 2273.
- [88] Kessler MA, Meinitzer A, Petek W, Wolfbeis OS. Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the Albumin Blue 580 fluorescence assay. Clinical Chemistry 43 (1997): 996.
- [89] Laiwattanapaisal W, Saythanu P, Nubtueboon P, Tencomnao T, Santiyanont R. A High-throughput Nonimmunological Method for Determination of Microalbuminuria Based on Utilization of Albumin Blue 580. American Society for Clinical Pathology Lab Medicine 39 (2008): 727-9.
- [90] Lin CC, Tseng CC, Huang CJ, Wang JH, Lee GB. An integrated microfluidic chip for non-immunological determination of urinary albumin. Biomedical microdevices 12 (2010): 887-96.
- [91] Lin CC, Hsu JL, Tseng CC, Lee GB. An integrated microfluidic system for the determination of microalbuminuria by measuring the albumin-to-creatinine ratio. Microfluidics and Nanofluidics (2011): 1-13.

- [92] Laiwattanapaisal W, Kunanuvat U, Intharachuti W, Chinvongamorn C, Hannongbua S, Chailapakul O. Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria. Talanta 79 (2009): 1104-10.
- [93] Viberti G, Vergani D. Detection of potentially reversible diabetic albuminuria. A three-drop agglutination test for urinary albumin at low concentration. Diabetes 31 (1982): 973.
- [94] Mogensen C, Chachati A, Christensen C, Close C, Deckert T, Hommel E, et al. Microalbuminuria: an early marker of renal involvement in diabetes. Renal Failure 9 (1985): 85-95.
- [95] Medcalf E, Newman D, Gorman E, Price C. Rapid, robust method for measuring low concentrations of albumin in urine. Clinical Chemistry 36 (1990): 446.
- [96] Laiwattanapaisal W, Songjaroen T, Maturros T, Lomas T, Sappat A, Tuantranont A. On-Chip Immunoassay for Determination of Urinary Albumin. Sensors 9 (2009): 10066-79.
- [97] Opheim K, Glick M, Ou C, Ryder K, Hood L, Ainardi V, et al. Particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay for theophylline evaluated with the Du Pont aca. Clinical Chemistry 30 (1984): 1870.
- [98] Gotelli G, Mitchell M. Particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay for theophylline with a centrifugal analyzer. Clinical Chemistry 31 (1985): 1085.
- [99] Parant F, Moulisma M, Gagnieu MC, Lardet G. Hydroxyzine and metabolites as a source of interference in carbamazepine particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA). Therapeutic drug monitoring 27 (2005): 457.
- [100] Dodig S. Interferences in quantitative immunochemical methods. Biochemical Medicine 19 (2009): 50-62.
- [101] Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. Blood Transfusion 5 (2007): 227.
- [102] Molina Bolívar J, Galisteo González F. Latex immunoagglutination assays. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews 45 (2005): 59-98.

- [103] Brillhart KL, Whiteside JA. Method for reducing non-specific aggregation of latex microparticles in the presence of serum or plasma. Google Patents; 2005.
- [104] Molina-Bolivar J, Galisteo-Gonzalez F, Hidalgo-Alvarez R. Latex immunoassays: comparative studies on covalent and physical immobilization of antibodies. II. IgG. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 9 (1998): 1103-13.
- [105] Norde W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. Advances in Colloid and Interface Science 25 (1986): 267-340.
- [106] Douglas AS, Monteith CA. Improvements to immunoassays by use of covalent binding assay plates. Clinical Chemistry 40 (1994): 1833-7.
- [107] Kumar A, Larsson O, Parodi D, Liang Z. Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization. Nucleic Acids Research Journal 28 (2000): e71-e.
- [108] Schwartz CF. Solid phase immunoassay. Google Patents; 1998.
- [109] Demeneix B, Behr JP. Polyethylenimine (PEI). Advances in Genetics 53 (2005): 215-30.
- [110] Mészáros R, Thompson L, Bos M, De Groot P. Adsorption and electrokinetic properties of polyethylenimine on silica surfaces. Langmuir 18 (2002): 6164-9.
- [111] Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, et al. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. Gene Therapy 4 (1997): 409.
- [112] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proceedings of the National Academy of Sciences 92 (1995): 7297.
- [113] Bach DT, Robertson Jr CW. Absorbance, turbidimetric, fluorescence and nephelometric photometer. Google Patents; 1988.
- [114] Mou C, Zhou K, Davies E, Zhang L, Bennion I, editors. Fibre laser using a microchannel based loss tuning element for refractive index sensing. Society of Photo-optical Instrumentation Engineers (SPIE) 2009.

- [115] Alfeeli B, Pickrell G, Wang A. Sub-nanoliter spectroscopic gas sensor. Sensors 6 (2006): 1308-20.
- [116] Zhao Z, Duan Y. A low cost fiber-optic humidity sensor based on silica sol-gel film. Sensors and Actuators B: Chemical (2011).
- [117] Wolfbeis OS. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. Analytical Chemistry 80 (2008): 4269-83.
- [118] Saxl T, Khan F, Ferla M, Birch D, Pickup J. A fluorescence lifetime-based fibre-optic glucose sensor using glucose/galactose-binding protein. Analyst 136 (2011): 968-72.
- [119] Xu F, Zhen G, Textor M, Knoll W. Surface plasmon optical detection of β -lactamase binding to different interfacial matrices combined with fiber optic absorbance spectroscopy for enzymatic activity assays. Biointerphases 1 (2006): 73.
- [120] Viveros L, Paliwal S, McCrae D, Wild J, Simonian A. A fluorescence-based biosensor for the detection of organophosphate pesticides and chemical warfare agents. Sensors and Actuators B: Chemical 115 (2006): 150-7.
- [121] Rissin DM, Walt DR. Digital concentration readout of single enzyme molecules using femtoliter arrays and Poisson statistics. Nano letters 6 (2006): 520-3.
- [122] Lai NS, Wang CC, Chiang HL, Chau LK. Detection of antinuclear antibodies by a colloidal gold modified optical fiber: comparison with ELISA. Analytical and Bioanalytical Chemistry 388 (2007): 901-7.
- [123] Wei H, Guo Z, Zhu Z, Tan Y, Du Z, Yang R. Sensitive detection of antibody against antigen F1 of *Yersinia pestis* by an antigen sandwich method using a portable fiber optic biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical 127 (2007): 525-30.
- [124] Salama O, Herrmann S, Tziknovsky A, Piura B, Meirovich M, Trakht I, et al. Chemiluminescent optical fiber immunosensor for detection of autoantibodies to ovarian and breast cancer-associated antigens. Biosensors and Bioelectronics 22 (2007): 1508-16.

- [125] Adányi N, Levkovets I, Rodriguez-Gil S, Ronald A, Váradi M, Szendro I. Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. Biosensors and Bioelectronics 22 (2007): 797-802.
- [126] Ahn S, Kulis DM, Erdner DL, Anderson DM, Walt DR. Fiber-optic microarray for simultaneous detection of multiple harmful algal bloom species. Applied and Environmental Microbiology 72 (2006): 5742-9.
- [127] Cho YK, Lee JG, Park JM, Lee BS, Lee Y, Ko C. One-step pathogen specific DNA extraction from whole blood on a centrifugal microfluidic device. Lab on a Chip 7 (2007): 565-73.
- [128] Hakkila K, Green T, Leskinen P, Ivask A, Marks R, Virta M. Detection of bioavailable heavy metals in EILATox Oregon samples using whole cell luminescent bacterial sensors in suspension or immobilized onto fibre optic tips. Journal of Applied Toxicology 24 (2004): 333-42.
- [129] Lin L, Xiao LL, Huang S, Zhao L, Cui JS, Wang XH, et al. Novel BOD optical fiber biosensor based on co-immobilized microorganisms in ormosils matrix. Biosensors and Bioelectronics 21 (2006): 1703-9.
- [130] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 (1976): 248-54.
- [131] Nisman R, Dellaire G, Ren Y, Li R, Bazett-Jones DP. Application of quantum dots as probes for correlative fluorescence, conventional, and energy-filtered transmission electron microscopy. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 52 (2004): 13.
- [132] Coleman D, Russell W, Hodgson J, Pe T, Mowbray J. Human papovavirus in Papanicolaou smears of urinary sediment detected by transmission electron microscopy. Journal of Clinical Pathology 30 (1977): 1015-20.

- [133] Mayer A, Antonietti M. Investigation of polymer-protected noble metal nanoparticles by transmission electron microscopy: control of particle morphology and shape. Colloid & Polymer Science 276 (1998): 769-79.
- [134] Engel A, Colliex C. Application of scanning transmission electron microscopy to the study of biological structure. Current Opinion in Biotechnology 4 (1993): 403-11.
- [135] Smith K, Oatley C. The scanning electron microscope and its fields of application. British Journal of Applied Physics 6 (1955): 391.
- [136] Reimer L, Kohl H. Transmission electron microscopy: physics of image formation. Springer Verlag; 2008.
- [137] Laboratories B. Adsorption to Microspheres. Bangs Laboratories, Inc. TechNote 204 (2008).
- [138] Myles P, Cui J. I. Using the Bland–Altman method to measure agreement with repeated measures. British Journal of Anaesthesia 99 (2007): 309.
- [139] Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 21 (1983): 709-20.
- [140] Bakker A. Immunoturbidimetry of urinary albumin: prevention of adsorption of albumin; influence of other urinary constituents. Clinical Chemistry 34 (1988): 82-6.
- [141] Roberts WL, Calcote CB, Cook CB, Gordon DL, Moore ML, Moore S, et al. Comparison of four commercial urinary albumin (microalbumin) methods: implications for detecting diabetic nephropathy using random urine specimens. Clinica Chimica Acta 273 (1998): 21-33.
- [142] Bakker AJ, Bierma-Ram A, Keidel H, Syperda H, Zijlstra A. (Micro) Albuminuria: Antigen Excess Detection in the Roche Modular Analyzer. Clinical Chemistry 51 (2005): 1070-1.

- [143] Jury D, Mikkelsen D, Dunn P. Prozone effect and the immunoturbidimetric measurement of albumin in urine. Clinical Chemistry 36 (1990): 1518-9.
- [144] Nitecki DE, Moreland M. Novel cross-linking agents. Google Patents; 1991.
- [145] Bayramoglu G, Yakup Arica M. Adsorption of Cr (VI) onto PEI immobilized acrylate-based magnetic beads: isotherms, kinetics and thermodynamics study. Chemical Engineering Journal 139 (2008): 20-8.
- [146] Spencer K, Price C. Kinetic immunoturbidimetry: the estimation of albumin. Clinica Chimica Acta 95 (1979): 263-76.
- [147] Lucas LJ, Han JH, Chesler J, Yoon JY. Latex immunoagglutination assay for a vasculitis marker in a microfluidic device using static light scattering detection. Biosensors and Bioelectronics 22 (2007): 2216-22.
- [148] Thakkar H, Newman D, Holownia P, Davey C, Wang C, Lloyd J, et al. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric inhibition assay for urine albumin on the Dade aca (R) analyzer. Clinical Chemistry 43 (1997): 109.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมบัฟเฟอร์เพื่อใช้ในการทดลอง

1.1 การเตรียม 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.4

สารละลาย A : KH_2PO_4 0.5 M (anhydrous 68.04 g/L)

สารละลาย B : K_2HPO_4 0.5 M (anhydrous 87.09 g/L)

ตวงสารตามปริมาตรดังนี้

pH	0.1 M	
7.4	สารละลาย A (mL)	สารละลาย B (mL)
	38	162

เติม Milli Q water จนครบ 1000 mL สัดส่วนระหว่างสารละลาย A และ B ทำให้ได้ pH=7.4 โดยไม่ต้องปรับ pH ก่อนใช้นำมาเจือจางบัฟเฟอร์ด้วย Milli Q water เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน (0.45 micron membrane filter, Pall Corporation)

1.2 การเตรียม 20 mM Tris/HCL buffer pH 7.4

ชั่ง Tris (MW =121.14) จำนวน 2.42 กรัม แล้วเติม Milli Q water ลงไป 900 mL ทำการปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 โดยใช้ 1 M HCl จากนั้นเติม Milli Q water จนครบ 1000 mL

1.3 การเตรียม 100 mM phosphate sodium buffer, pH 7.4

เตรียม สารละลาย A : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW = 138) 0.1 M

(ชั่งสาร 13.8 g เติม Milli Q water จนครบ 1000 mL)

เตรียม สารละลาย B : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MW = 358.14) 0.1 M

(ชั่งสาร 35.8 g เติม Milli Q water จนครบ 1000 mL)

ดวงสารตามปริมาตรดังนี้

pH	0.1 M	
7.4	สารละลาย A (mL)	สารละลาย B (mL)
	95	405

เติม Milli Q water จนครบ 1000 mL สัดส่วนระหว่างสารละลาย A และ B ทำให้ได้ pH=7.4 โดยไม่ต้องปรับ pH ก่อนใช้นำมาเจือจางบัฟเฟอร์ด้วย Milli Q water เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน (0.45 micron membrane filter, Pall Corporation)

2. การเตรียมน้ำยาสำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลบูมินในปัสสาวะเพื่อการเปรียบเทียบกับวิธีที่พัฒนาขึ้น

ใช้น้ำยาและขั้นตอนการตรวจวัดของ Biosystems S.A. (Barcelona, Spain) ดังนี้

Working reagent : ผสมน้ำยา B:น้ำยา A ในอัตราส่วน 1:4 เก็บไว้ใช้ได้นาน 15 วัน ที่ 2-8 °C

Albumin standard : เติม Milli Q water ลงไป 1 mL ผสมเบาๆ ให้เข้ากันดี อายุการใช้งาน 1 เดือนที่ 2-8 °C

1. นำน้ำยาออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและปรับอุณหภูมิเครื่อง spectrophotometer ไว้ที่ 37 °C
2. ดูดสารตามตารางลงใน plastic cuvette

Working reagent	1 mL
Standard หรือ Sample	7 μL

3. ผสมสารให้เข้ากันแล้วนำไปบันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm หลังจาก 10 วินาที (A1) และหลัง 2 นาที (A2)

การคำนวณความเข้มข้นของอัลบูมิน

$$\text{ความเข้มข้นของอัลบูมินในปัสสาวะ (mg/L)} = \left\{ \frac{(A2 - A1) \text{ Sample}}{(A2 - A1) \text{ Standard}} \right\} \times \text{ความเข้มข้น Standard (mg/L)}$$

3. การเตรียม Stock ของ human serum albumin standard (10 mg/mL)

ชั่ง human serum albumin 10 mg และเติม 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 ปริมาตร 1000 μ L ลงไปผสมให้เข้ากันดี แบ่งใส่ microcentrifuge tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$ C ก่อนนำมาใช้งานให้นำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายแล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

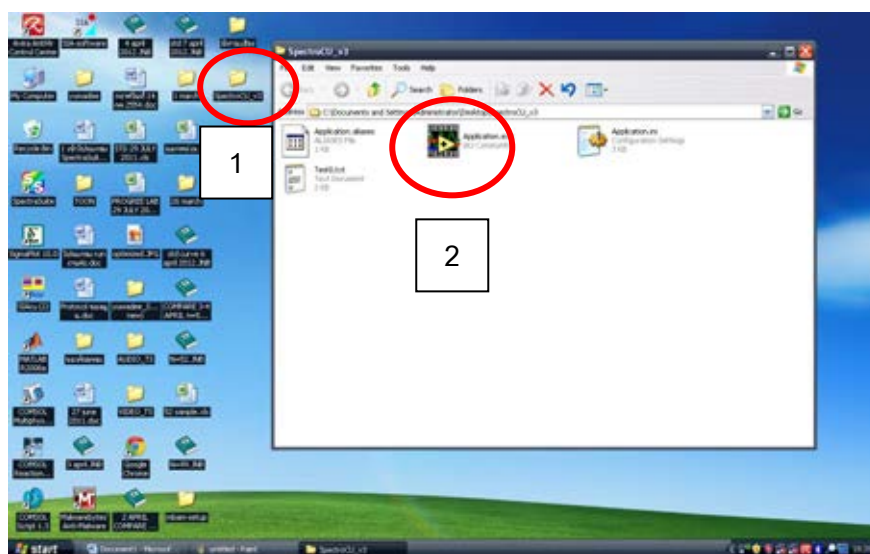
4. การเตรียม 0.9% NSS (Normal Saline Solution)

ชั่ง NaCl จำนวน 0.9 กรัม แล้วเติม Milli Q water ลงไป 100 mL นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน (0.45 micron membrane filter, Pall Corporation)

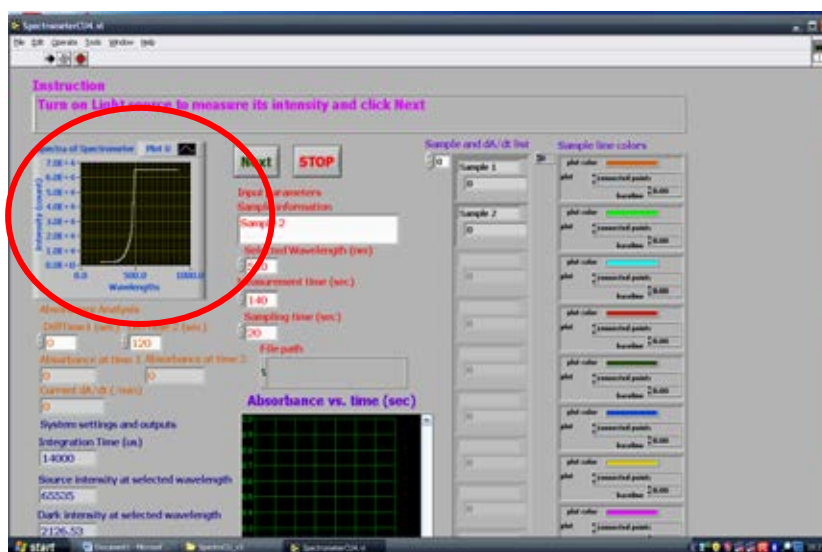
ภาคผนวก ข

การใช้โปรแกรม SpectroCU_V3

1. หลังจากเชื่อมต่อระบบ portable กับคอมพิวเตอร์เรียบร้อยแล้ว จึงเปิด light source, เครื่องควบคุมอุณหภูมิ และพัดลมดูดความร้อน จากนั้นเปิดโปรแกรม SpectroCU_V3 จะปรากฏหน้าต่างใหม่ขึ้นดังภาพ



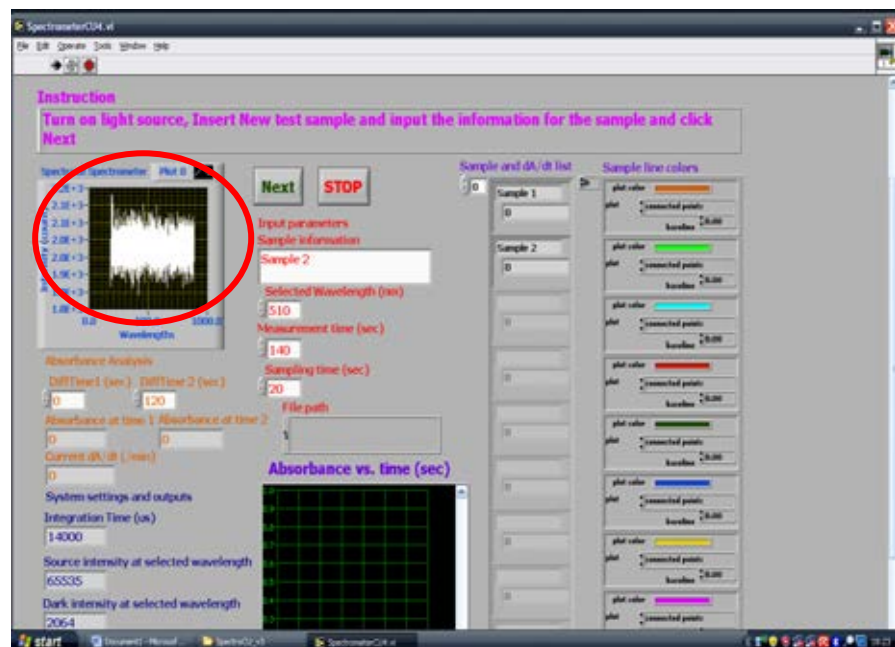
2. double click ที่ Application.exe จะปรากฏหน้าจอสำหรับการตรวจวัด มีกราฟ ความเข้มแสงจาก light source อยู่ด้านบนซ้ายดังภาพ => click Next ตามคำสั่งในช่อง Instruction



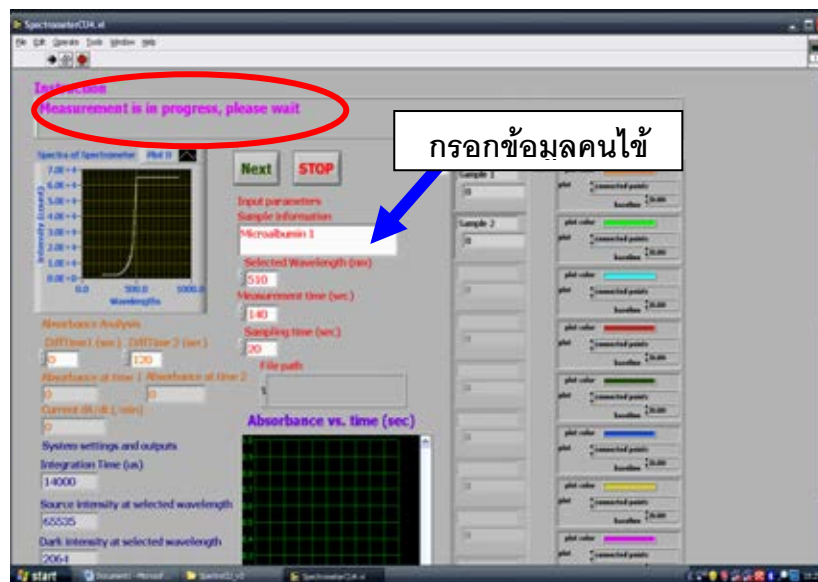
3. ปิด light source ด้านหลังเครื่อง portable เพื่อวัด dark intensity และ click Next



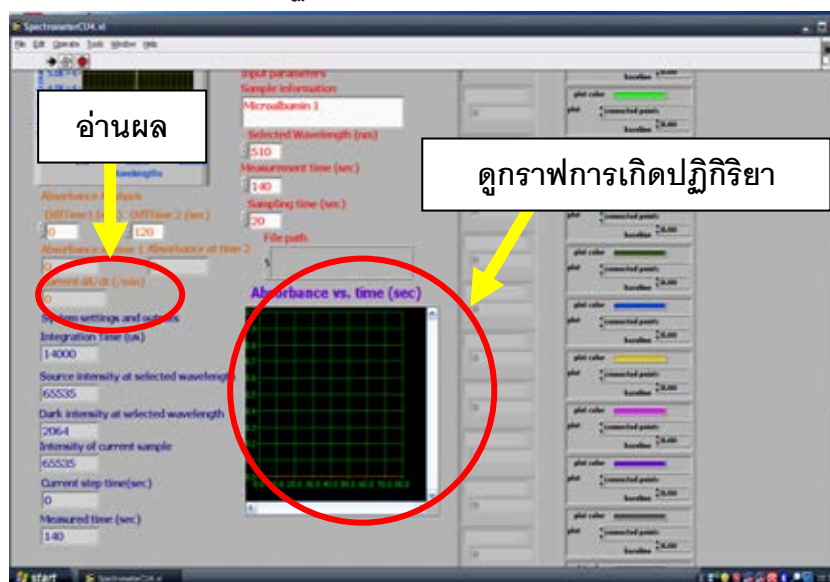
4. จะปรากฏกราฟความเข้มแสงขึ้นใหม่ ดังภาพ



5. เปิด light source , เตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ และ กรอกข้อมูลคนไข้ลงในช่อง Sample information เมื่อวาง cuvette ลงใน cuvette holder ปิดหน้าต่างกันแสงแล้ว จึง click Next อีกครั้งเพื่อทำการตรวจวัด จะปรากฏหน้าจอดังภาพ



6. เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นหลัง 2 นาทีให้อ่านค่าอัตราดูดกลืนแสงในช่อง Current dA/dt (min) และติดตามกราฟระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจากหน้าจอ Absorbance vs. time (sec)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรรษยา สินวัต เกิดเมื่อวันที่ 28 พฤศจิกายน พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2542 จากนั้นได้ปฏิบัติงานในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ ที่บริษัทกรุงเทพอาร์ไอเอแอนด์พี และ บริษัทเนชั่นแนล เฮลท์แคร์ ซิสเต็มส์ ในปี พ.ศ. 2543 และ 2545 ตามลำดับ ก่อนเข้าศึกษาต่อ ในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 โดยได้รับทุนผู้ช่วยวิจัยจากสำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)