

นิพนธ์ต้นฉบับ**การตรวจวัดระดับ serum ferritin โดยวิธี indirect sandwich ELISA**

จตุพันธ์ กิตติผลาด*, ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา**

บทคัดย่อ

ระดับของ serum ferritin มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็ก และการติดตามผลในการรักษา การศึกษาวิจัยนี้เป็นการเตรียมวิธีการทดสอบเพื่อหาระดับ ferritin ในซีรัม โดยวิธี indirect sandwich ELISA ในกลุ่มประชากรปกติในวัยเจริญพันธุ์, กลุ่มผู้ป่วยโรคโลหิต และกลุ่มผู้ป่วยเด็กอายุ 1-14 ปี ในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โดยนำค่า ferritin ในกลุ่มประชากรปกติในวัยเจริญพันธุ์มาหาค่าทางสถิติโดยมีการแยกเพศ กลุ่มประชากรหญิงมีค่า ferritin เฉลี่ย 21.43 ± 17.2 ng/ml กลุ่มประชากรชายมีค่า ferritin เฉลี่ย 39.97 ± 26.82 ng/ml การตรวจวัดระดับ ferritin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคโลหิตจำนวน 42 รายพบว่า 1 รายมีระดับ ferritin ต่ำกว่าปกติ คิดเป็นร้อยละ 2.8 แม้ว่าผู้ป่วยโรคโลหิตทุกรายจะผ่านการตรวจกรอง hemoglobin โดยใช้ยาจูนสีก็ตาม สำหรับตรวจวัดระดับ ferritin ในผู้ป่วยเด็กอายุ 1-14 ปีในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่จำนวน 37 รายพบว่า 5 รายมีระดับ ferritin สูงกว่าปกติ, 22 รายมีระดับ ferritin อยู่ในช่วงปกติ และ 9 รายมีระดับ ferritin ต่ำกว่าปกติ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2546; 36: 91-99.

คำรหัส : serum ferritin, ภาวะโลหิตจางเนื่องจากขาดเหล็ก, indirect sandwich ELISA

* นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 ปีการศึกษา 2539

** ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคณบดี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Email: asimi002@chiangmai.ac.th

Abstract : Detection of Serum Ferritin by Indirect Sandwich ELISA**Juttifun Kidchalard*, Chatchai Tayapiwatana****

Serum ferritin is useful for iron deficiency anemia diagnosis and follow-up the treatments. The indirect sandwich ELISA was used for determining ferritin concentration in human serum. In this study, 3 groups of subject were classified; mature normal, blood donor, and 1 to 14 year patients in Maharaj Nakorn Chiang Mai hospital. The statistic values of ferritin in females is 21.43 ± 17.2 ng/ml and 39.97 ± 26.82 ng/ml in males. The level of ferritin in blood donors indicated that 1 out of 42 had serum ferritin lower than normal value, although all of them had passed the classical CuSO_4 test. For the 1 to 14 year patient, 5 out of 37 had serum ferritin level higher than the normal value. Nine of this group had serum ferritin level lower than normal value. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2003; 36: 91-99.

Key words: serum ferritin, iron deficiency anemia, indirect sandwich ELISA

* Fourth year standing MT student, 1996

** Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences Chiang Mai University

บทนำ

เฟอริติน (ferritin) เป็นกลุ่มโมเลกุลที่จับรวมตัวระหว่างเหล็กกับโปรตีน ชนิดหนึ่งที่เรียกว่าอะโปเฟอริติน (apoferritin) เฟอริตินจะพบได้ในเซลล์ของร่างกายเกือบทุกแห่ง เช่น เซลล์ของตับม้าม ไชกระดูก ผนังลำไส้ และสามารถตรวจพบได้ในซีรัมซึ่งจะมีปริมาณเป็นสัดส่วนกับเหล็กที่ร่างกายสะสมไว้ (iron storage) การหาปริมาณของเฟอริตินในซีรัมจะมีส่วนช่วยในการวินิจฉัยโรคโลหิตจางจากการขาดเหล็ก (Iron deficiency) โดยเฉพาะในระยะเริ่มแรกของการเป็นโรค จะพบว่าปริมาณของเฟอริตินในซีรัมมีค่าต่ำลงก่อนที่จะตรวจพบความผิดปกติของฮีโมโกลบิน เนื่องจากในระยะเริ่มต้นอาจมีการขาดเพียงในแหล่ง

สะสม (Storage) หรือระดับในพลาสมาต่ำลง โดยไม่มีภาวะซีดก็ได้ ต่อเมื่อการขาดมีมากขึ้นจนเหล็กไม่พอที่จะนำมาสร้างฮีโมโกลบิน จึงทำให้เกิดอาการซีดชัดเจนขึ้น ผู้ป่วยที่มีภาวะซีดจากการขาดเหล็กจะพบการเปลี่ยนแปลงทางการเจริญเติบโตของสมองมาก โดยเฉพาะในเด็กเล็กจะมีผลระยะยาวต่อสมอง ทำให้การพัฒนาการเรียนรู้และการตอบสนองต่อสิ่งต่างๆ ช้ากว่าปกติ²⁻⁴ ในกลุ่มเด็กเล็กนั้นแม้ว่าจะให้การรักษาด้วยเหล็กก็ไม่สามารถป้องกันผลเสียในระยะยาวได้ อย่างไรก็ตามการให้เหล็กเป็นเวลานานอาจทำให้ผลเสียในระยะยาวน้อยลงได้ สำหรับหญิงตั้งครรภ์ที่ขาดเหล็กจะซีดและซีรัมเฟอริตินต่ำกว่า $10 \mu\text{g/l}$ จะมีอัตราคลอดก่อนกำหนดสูงถึง ร้อยละ 50⁵ นอกจากนี้การหา

ปริมาณของ ferritin ในซีรัมยังช่วยในการแยก iron deficiency ออกจาก hypochromic anemia ชนิดอื่น

ในส่วนของ การวิเคราะห์หาปริมาณของซีรัม ferritin นั้น สามารถหาได้จากหลายวิธี เช่น immunoradiometric assay (IRMA) วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งปัจจุบันได้มีการผลิตชุดสำเร็จรูปสำหรับตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัมจำหน่าย แต่ใช้สำหรับวัดระดับ ferritin ในซีรัมในค่าสูง ช่วยในการวินิจฉัยมะเร็งหลายชนิด เช่น leukemia ชนิดเฉียบพลัน, Hodgkin 's disease⁶, มะเร็งปอด, มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาเทคนิค indirect sandwich ELISA เพื่อใช้ในการตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัมเพื่อช่วยในการวินิจฉัยภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็ก ซึ่งสามารถใช้ทดแทนวิธีการอื่น เช่น การตรวจดู iron granule วิธีนี้ต้องมีการเจาะไขกระดูก ซึ่งเป็นการยุ่งยาก, การวัด total transferrin ในบางครั้งจะแปลผลยากถ้ามีการขาดเหล็กและการติดเชื่อมร่วมกันอยู่, การตรวจ red cell indices⁷ ระดับ mean corpuscular volume (MCV) บอกถึงขนาดของเซลล์ และ mean corpuscular hemoglobin (MCH) บอกถึงอัตราส่วน hemoglobin ต่อ hematocrit จะช่วยในการบอกความรุนแรงของ hypochromia ด้วย อย่างไรก็ตาม การใช้ red cell indices นี้ถ้า

ผู้ป่วยมีเม็ดเลือดแดงที่แตกต่างกันมากในขนาดและการติดสี จะทำให้แปลผลได้ยาก

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

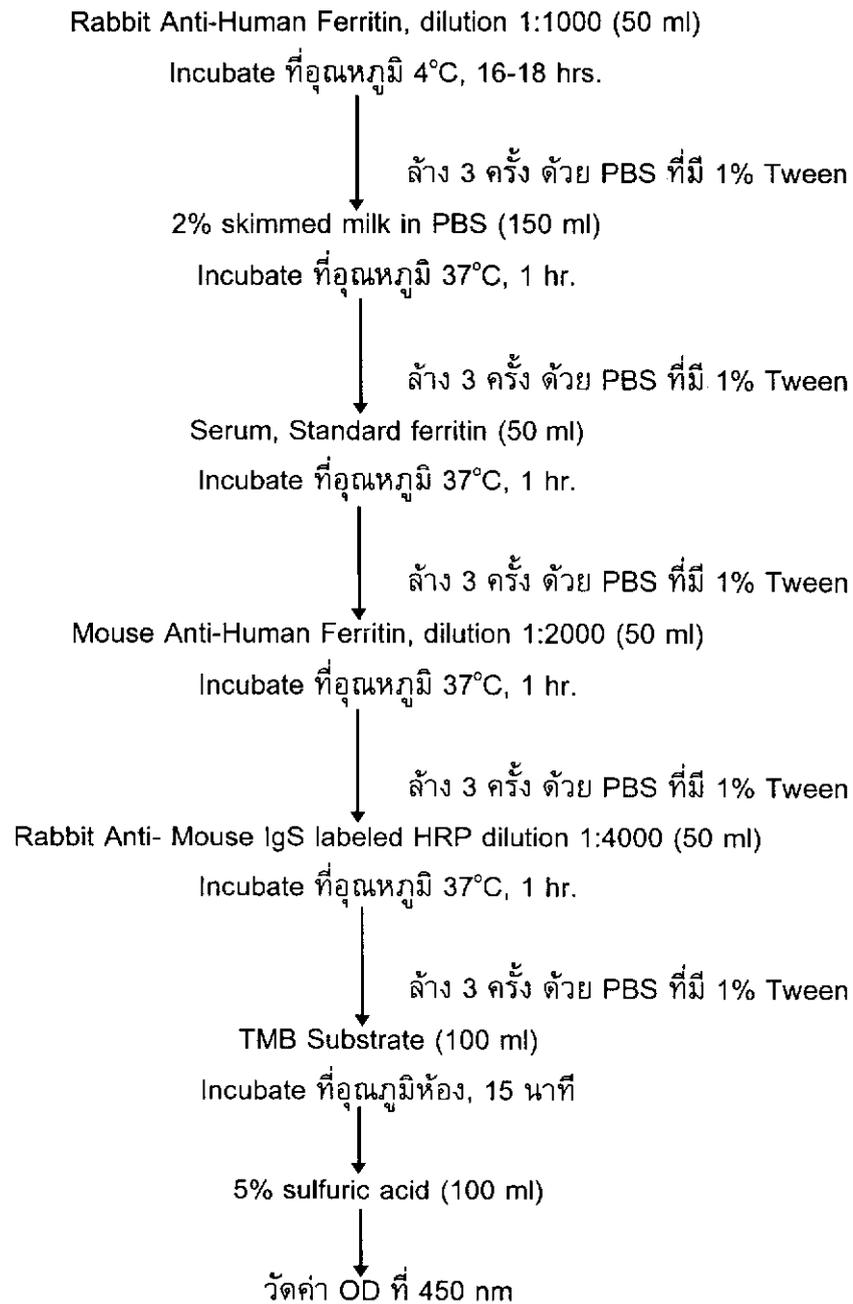
ซีรัมจากประชากรปกติในวัยเจริญพันธุ์จำนวน 66 ราย

ซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วยโรคโลหิตจาง จำนวน 42 ราย

ซีรัมจากผู้ป่วยเด็กอายุ 1-14 ปี ในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 37 ราย

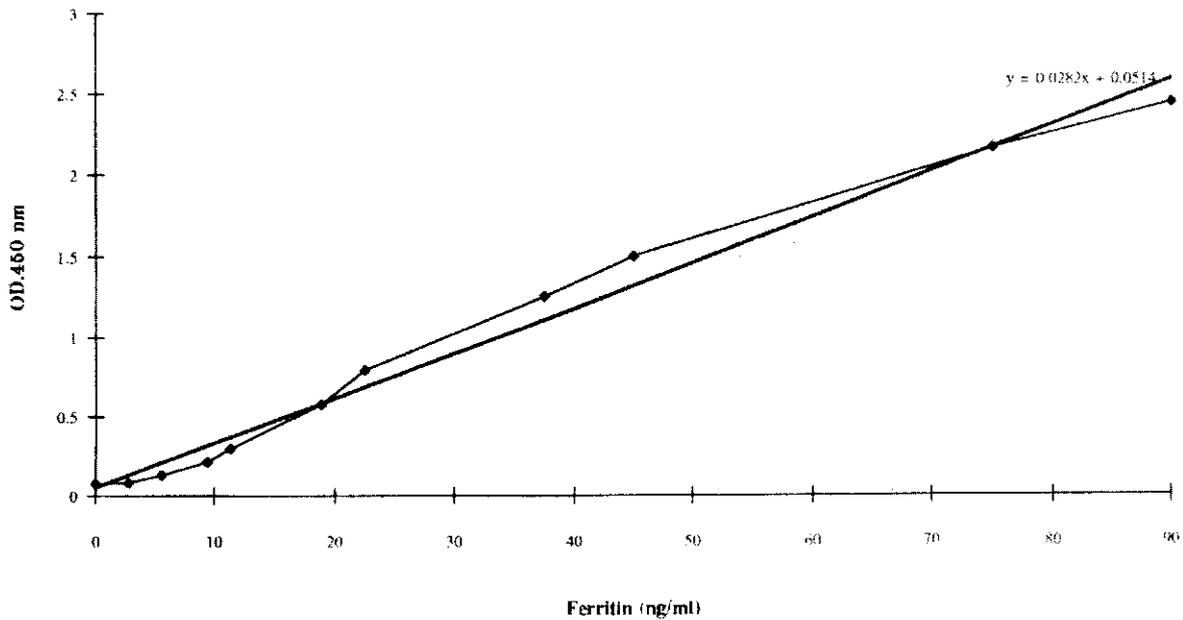
2. การตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัมโดย indirect sandwich ELISA (รูปที่ 1)

ทำการเคลือบหลุม ELISA ด้วย rabbit anti-ferritin antibody (Zymed, cat. No. 18-0019) เดิม standard ferritin (SIGMA, Cat no. F 6754) หรือซีรัมตัวอย่าง ล้างส่วนเกินทิ้ง แล้วเติม mouse anti-ferritin antibody (Zymed, cat no. 03-3000) หลังจากนั้นเติม rabbit anti-mouse IgS labelled HRP (DAKO, cat no. P0260) เดิม TMB substrate ลงไปเพื่อทดสอบการเกิดสี หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% sulfuric acid แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณโดยหาความสัมพันธ์จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำ Indirect Sandwich ELISA

Standard Curve for Ferritin Assay



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของ serum ferritin ค่าสมการเส้นตรง $y=0.03X + 0.05$

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัม โดยวิธี Indirect Sandwich ELISA และใช้ standard ferritin เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานและนำสมการเส้นตรงของเส้นแนวโน้มมาคำนวณค่า ferritin ที่สภาวะนี้มีความไวในการตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัมประมาณ 5 ng/ml และมีความน่าเชื่อถือจนถึง 90 ng/ml เพราะสมการเส้นตรงของเส้นแนวโน้มใน Standard curve ที่ใช้ในการคำนวณเริ่มตั้งแต่ 0 ng/ml จนถึง 90 ng/ml เนื่องจากถ้าสูงกว่านี้ค่า OD และระดับ ferritin จะไม่เป็นสัดส่วนต่อกัน

การตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัม ในกลุ่มประชากรปกติในวัยเจริญพันธ์จำนวน 66 ราย นำค่า ferritin ที่ได้มาคำนวณทางสถิติ ค่าเฉลี่ย ferritin ของหญิงคือ 21.43 ng/ml มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 17.22 ค่าเฉลี่ย ferritin ของชายคือ 39.97 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 26.82 เมื่อเปรียบเทียบค่า ferritin ที่ได้กับค่า ferritin ปกติ (10 ng/ml) พบว่า 52 รายมีระดับ ferritin อยู่ในช่วงปกติ (หญิง 28 ราย, ชาย 24 ราย) 14 รายมีระดับ ferritin ต่ำกว่าปกติ ในกลุ่มที่มีระดับ ferritin ต่ำกว่าปกตินี้บางรายมีภาวะซีด หรือมีลักษณะของเม็ดเลือดแดงที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ (จากการดู blood smear) ซึ่งสอดคล้องกับระดับ

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัมในกลุ่มประชากรวัยเจริญพันธุ์*

No.	Ferritin (ng/ml)	No.	Ferritin (ng/ml)	No.	Ferritin (ng/ml)
1	4.50	23	12.79	45	13.63
2	8.85	24	12.50	46	37.30
3	4.35	25	7.94	47	70.37
4	26.00	26	37.07	48	81.95
5	6.58	27	50.27	49	75.22
6	6.08	28	17.15	50	44.29
7	34.61	29	18.80	51	12.31
8	42.81	30	37.04	52	31.46
9	11.73	31	19.10	53	37.91
10	66.69	32	26.42	54	4.15
11	6.58	33	30.29	55	49.45
12	26.46	34	2.92	56	17.35
13	14.79	35	11.96	57	0.00
14	37.81	36	54.10	58	7.70
15	26.19	37	4.00	59	17.32
16	22.52	38	15.85	60	78.17
17	21.63	39	53.52	61	40.12
18	10.94	40	3.21	62	11.17
19	12.83	41	18.67	63	76.68
20	10.44	42	89.04	64	36.68
21	45.58	43	38.90	65	34.87
22	5.19	44	86.14	66	21.73

* เพศชาย

จากผลการตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัม ในกลุ่มประชากรปกติในวัยเจริญพันธุ์ จำนวน 66 รายพบว่าระดับ ferritin ในซีรัมต่ำกว่าปกติ 14 ราย คิดเป็น 21.21 % (หญิง 12 ราย, ชาย 2 ราย) ระดับ ferritin ในซีรัมอยู่ในช่วงปกติ 52 ราย คิดเป็น 78.79 % (หญิง 28 ราย, ชาย 24 ราย) ไม่มีรายใดที่มีระดับ ferritin ในซีรัมสูงกว่าปกติ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัม ในผู้ป่วยโรคโลหิต

No.	Ferritin (ng/ml)	No.	Ferritin (ng/ml)	No.	Ferritin (ng/ml)
1	83.19	15	***	29	72.83
2	64.95	16	24.58	30	74.22
3	82.28	17	82.47	31	38.70
4	71.44	18	71.69	32	30.97
5	85.33	19	88.58	33	63.48
6	26.17	20	77.13	34	48.83
7	55.13	21	2.58	35	32.36
8	15.78	22	57.81	36	45.25
9	23.66	23	78.56	37	70.47
10	44.95	24	39.98	38	70.31
11	65.14	25	49.75	39	55.25
12	21.44	26	34.61	40	21.59
13	61.14	27	52.56	41	75.22
14	58.78	28	41.22		

จากผลการทดลองพบว่าซีรัม 1 รายที่มีระดับ ferritin ในซีรัม ต่ำกว่าปกติ (No. 21)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัมในผู้ป่วยเด็กอายุ 1-14 ปี ในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

No.	Ferritin (ng/ml)	No.	Ferritin (ng/ml)
1	31,510.00	19	45.57
2	3,883.50	20	45.02
3	1,250.00	21	40.95
4	886.00	22	36.61
5	687.00	23	35.08
6	80.80	24	32.89
7	80.19	25	31.61
8	78.52	26	18.49
9	76.68	27	18.38
10	74.53	28	11.67
11	73.77	29	8.02
12	72.10	30	7.42
13	58.86	31	6.03
14	56.58	32	5.31
15	55.28	33	2.88
16	52.77	34	0.48
17	47.07	35	0.00
18	46.04	36	0.00

จากผลการทดลองพบว่า ซีรัมจำนวน 5 รายมีระดับ ferritin สูงกว่าปกติ, 22 ราย มีระดับ ferritin อยู่ในช่วงปกติ และ 9 ราย มีระดับ ferritin ต่ำกว่าปกติ

ferritin บางรายซึ่ด แต่มีขนาดของเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลง (ทราบจากการซักประวัติการตรวจลักษณะของเม็ดเลือดแดง เช่น $MCV < 80$ fl) แสดงถึงเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็กกล และบางรายไม่มีความผิดปกติใดๆ อาจเป็นเพราะเพิ่งอยู่ในระยะเริ่มต้นของการขาดเหล็ก

การตรวจวัดระดับ ferritin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคโลหิต 42 ราย ที่ผ่านการตรวจกรองฮีโมโกลบินโดยใช้น้ำยาจุนสี พบว่ามี 1 รายที่มีระดับ ferritin ต่ำกว่าปกติ คิดเป็นร้อยละ 2.8 แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคโลหิตรายนี้เริ่มมีการขาดเหล็ก ซึ่งไม่สามารถทราบได้จากการตรวจกรองฮีโมโกลบิน การตรวจวัดระดับ ferritin ในซีรัมของผู้ป่วยเด็กอายุ 1-14 ปี ในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จำนวน 37 ราย พบว่า 5 รายมีระดับ ferritin สูงกว่าปกติ (No.1-5), 22 รายมีระดับ ferritin อยู่ในช่วงปกติ (No.6-28) 9 รายมีระดับ ferritin ต่ำกว่าปกติ (No.29-36) ผู้ป่วยเด็กที่มีระดับ ferritin สูงกว่าปกติ 2 ราย โดยมีการวินิจฉัยเบื้องต้นของแพทย์ว่าเป็น มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphoblastic leukemia (ALL) จากการค้นคว้าพบว่าโรคนี้มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ ferritin ในซีรัม และ 1 รายมีการวินิจฉัยเบื้องต้นว่ามี ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS) ที่มีระดับ ferritin สูงอาจเนื่องมาจากการติดเชื้อต่างๆ ในร่างกาย สำหรับรายที่มีระดับ ferritin ต่ำกว่าปกติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับผลการวินิจฉัยเบื้องต้นของแพทย์ จึงไม่สาเหตุที่แท้จริงของการมีระดับ ferritin ลดลงต่ำกว่าปกติ

การตรวจวัดระดับ ferritin โดยวิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการติดตามผลการรักษาผู้ป่วยโลหิตจางจากการขาดเหล็ก เมื่อรักษาด้วย ferrous sulfate แล้วผู้ป่วยมีระดับ ferritin เพิ่มขึ้นหรือไม่ และเป็นแนวทางในการระวังป้องกันภาวะขาดเหล็กในเด็ก ผู้บริจาคโลหิต รวมทั้งประชากรทั่วไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. อานนท์ บุญรัตเวช. โลหิตวิทยา เม็ดเลือดแดง. กรุงเทพฯ. ฟันนี้พับบลิชชิง , 2535: 88-89 .
2. Lozoff B, Jimener E , Abraham W. Long-term development outcome of infants with iron deficiency. N Eng J Med ; 325 : 687-94
3. Lozoff B. Behavior altations in iron deficiency. Adv-Pediat 1988 ; 35 : 331-59 .
4. Lozoff B. Iron and learning potential in childhood. Bull-N-Y Aca Med 1989 ; 65 : 1050-66
5. Ulmer H, Goepel E. Anemia. Ferritin and preterm labor. J Perinamed 1988 ; 16 : 459-65
6. พันธุ์เทพ อังชัยสุขศิริ, แสงสุรีย์ จูทา. Hodgkin 's disease. ตำราโลหิตวิทยา การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย 2536 : 626-652.
7. Cook J. Clinical evaluation of iron deficiency. Seminars Hematol 1982 ; 19 : 6-18.