

27 MAY 1991

วารสาร เทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่



BULLETIN OF
CHIANG MAI
ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 23 ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน 2533

VOLUME 23 NUMBER 3 SEPTEMBER 1990 ISSN 0125-5347

ปณิธานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เป็นมหาวิทยาลัยแห่งแรกในส่วนภูมิภาค
จัดตั้งขึ้นตามนโยบายของรัฐและเจตนารมณ์ของประชาชนในภาคเหนือ
ให้เป็นศูนย์กลางทางวิชาการและวิชาชีพชั้นสูง
เพื่ออำนวยประโยชน์แก่ท้องถิ่นและประเทศชาติโดยรวม

มหาวิทยาลัยแห่งนี้เป็นแหล่งสะสม ค้นคว้า วิจัย และถ่ายทอดความรู้
ตามหลักการแห่งเสรีภาพทางวิชาการ โดยยึดมั่นในสัจธรรมและคุณธรรม
เพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการ การประยุกต์เผยแพร่และการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม
บัณฑิตแห่งมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พึงฝึกฝนการฝึกตน เป็นผู้มีจริง คิดเป็น ปฏิบัติได้
สามารถครองตน ครองคน ครองงาน ด้วยมโนธรรมและจิตสำนึกต่อสังคม

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

วัตถุประสงค์	เพื่อเผยแพร่ผลงานทางวิชาการสาขาเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด และสาขาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับทางด้าน วิทยาศาสตร์สุขภาพ	
เจ้าของ ที่ปรึกษากิตติมศักดิ์ ที่ปรึกษา	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โทรศัพท 221829 นายแพทย์ชัยโรจน์ แสงอุดม สนอง ไชยารัตน์ เนตร สวรรณกุลหาสน์ สนิท มกรแก้วเกียร ประสิทธิ์ ชนะรัตน์	
บรรณาธิการ	เดชา ร่มไทรย์	
รองบรรณาธิการ	วราณี คณาชีวะ	สิชล สงค์ศิริ
กองบรรณาธิการ	รุจภา นิมสังข์	จันจรี ศิริวิทยาการ
	เพ็ญศรี วรณมุล	ศุภร สดะพาหะ
	ระวีวรรณ รัชติเจริญรัตน์	สุมาลัย วัจวรรณรัตน์
	พรทิพย์ วัฒนาวิทวัส	วิยะดา ศักดิ์ศรี
ผู้จัดการ	จริยา กาทอง	
ฝ่ายจัดการ	กวีล เรนทร	ธวัช พยัคฆา
	มนัส ศรีสัตบุตร	สนั่น นันตะเสน
ฝ่ายทะเบียน	รัตนา สาคร	
ผู้ช่วยฝ่ายทะเบียน	นัทธยา ใจสัจด์ย	
เพริศณิก	สุภาพร นิลเกษ	
ศิลปกรรม	บรรลือ สัมสร	
กำหนดออก	ราย 4 เดือน (มกราคม, พฤษภาคม, กันยายน)	
พิมพ์	โรงพิมพ์โรงพยาบาลสวนปรุง เชียงใหม่	

BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

- OFFICIAL PUBLISHER :** Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
- OBJECTIVE :** Bull Chiang Mai AMS (ISSN 0125-5347) publishes original research reports, reviews, editorials, notes, letters to editor and abstracts. Manuscripts relevant to any and all aspects of medical technology, radiologic technology, occupational therapy and physical therapy are welcome.
- HONORED CONSULTANT :** Chairorj Saeng-Udom, M.D.
- CONSULTANTS :** Sanong Chaiyarasamee
Netr Suwankrughasn
Sanit Makornkawkeyoon
- EDITOR IN CHIEF :** Prasit Chanarat
- ASSOCIATE EDITOR :** Decha Romcai
- BOARD OF EDITORS**
- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| Warunee Kunachiwa | Sichon Songsiri |
| Rujapa Nimsung | Junjaree Siriwittayakorn |
| Pensri Vannareumol | Suporn Sutabaha |
| Raweewan Choatcharoenrat | Sumalai Vangvannarath |
| Pornpip Watanawittawas | Wiyada Saksri |
- BUSINESS MANAGER** Jariya Kathong
- MANAGER STAFFS**
- | | |
|--------------------|----------------|
| Tavil Rantorn | Tawat Payakkha |
| Manus Srisuttaboot | Sanun Nuntasen |
- REGISTRA** Ratana Sakorn
- ASSISTANT REGISTRAR** Nuttaya Jaisat
- TREASURER** Supaporn Nilakesh
- ILLUSTRATOR** Bhanleur Samosorn
- PUBLISHED** Tertially (January, May, September)
- SUBSCRIPTION** Subscriptions are to be prepaid; and rates per year :
\$ US 15 for all outsidess.
- EDITORIAL OFFICE :** All correspondence should be addressed to the editor
Prasit Chanarat.
Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University, Thailand 50002

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ปีที่ 23 ฉบับที่ 3 เดือน กันยายน 2533

สารบัญ

	หน้า
บทความวิจัย	
Application of Complement Clq for Serodiagnosis in Clinical Microbiology Fumiaki Taguchi	121
นิพนธ์ต้นฉบับ	
คอมพิวเตอร์ช่วยสอน : โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อความเข้าใจงานการแปลผล ทางห้องปฏิบัติการชันสูตร ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ และ นันทยา ชนะรัตน์	141
การใช้นิโคตคอมพิวเตอร้งานการพิสูจน์เชื้อแยกชนิดของ Enterbacteriaceae ไวรัววิทย์ เกดราไชยอนันต์ มารศรี ไกรโรจนานันท์ และ ประสิทธิ์ ธรวิจิตรกุล กลัยเคออีไมกัลบินานเม็ดเลือดแดงส่วนต่างๆ นันทยา ชนะรัตน์ เสกสรร แสนธิเลิศ และ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์	149
รายงานพิเศษ	
เทคนิคการวิจัยขั้นสูงทางภูมิคุ้มกันวิทยา : Catalytic Monoclonal Antibody ลีซล สงค์ศิริ	161
Production of Monoclonal Antibodies to Human Leukocytes Antigen วัชร กสิณฤกษ์	165
ปกิณกะ	
β -Hydroxybutyrate : ความสำคัญทางคลินิก นันทยา ชนะรัตน์	169
ตรวจรับ	175

BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

Volume 23 Number 3 September 1990

CONTENTS

	PAGE
Invited Article	
Application of Complement C1q for Serodiagnosis in Clinical Microbiology Fumiaki Taguchi	121
Research Articles	
Computer Aided Instruction : Computer Program of Enhanced Understanding in Clinical Laboratory Interpretation Prasit Chanarat and Nantaya Chanarat	141
Microcomputer and Microbiochemical Method for Rapid Identification of Enterbacteriaceae Vaiyawit Pettrachaijanant, Marasri Krairojananant and Prasit Tharavichitkul	149
Glycated Hemoglobin in Fractionated Red Blood Cells Nantaya Chanarat, Seksan Saentilert and Prasit Chanarat	155
Special Reports	
Catalytic Monoclonal Antibody Sichon Songsiri	161
Production of Monoclonal Antibodies to Human Leukocytes Antigen Watchara Kasinrerak	165
Miscellaneous	
β -Hydroxybutyrate : Clinical Significance Nantaya Chanarat	169
Index	175

Invited Article

APPLICATION OF COMPLEMENT C1q FOR SERODIAGNOSIS IN CLINICAL MICROBIOLOGY

Dr. Fumiaki Taguchi*

=====

Clinical diagnostic technology developed in the theory and techniques from tests for the diagnosis of bacterial infection and eventually developed into a science almost exclusively during the last 20 to 30 years. The first microbiological diagnostic laboratory became just a part of central diagnostic test facilities, while clinical chemistry laboratory which developed later is equipped with fully automated instruments and recurrently occupied the core of central laboratory facilities.

Even in tests for infectious disorders, there have been some improvements and discoveries of new techniques. However, with the exception of recently developed new methods such as enzyme immunoassay, radioimmunoassay or *in situ* hybridization technique, almost no progress has been made in the general principles of serodiagnosis of infectious diseases.

I am currently in the development of new antigen and antibody detection system using a labelled complement component C1q. Fortunately, it has become possible to produce peroxidase labelled C1q of sufficiently good quality for use in research and clinical laboratories. Using this complement, it is possible to measure complement fixing antibody or virus neutralizing antibody rapidly, precisely and quantitatively. Fully - automated procedures for the diagnosis of viral infections become also possible in near future. Before going into the main part of the today's presentation, I would like to talk a little bit of the brief outline of the history of serology.

*Professor and Chairman, Department of Microbiology, School of Hygienic Sciences, Kitasato University, Sagamihara, Kanagawa, Japan.

The mini history of serology

As you may know, the founder of Kitasato Institute and our Kitasato University is Late Dr. Shibasaburo Kitasato. He succeeded in the pure culture of *Clostridium tetani* under the anerobic condition in 1889, and in the next year of 1890, he discovered that *Clostridium tetani* produced lethal exotoxin, and the antitoxin was present in the serum from the animals which were administrated with the stepwisely increased amounts of the toxin, and finally, that when serum containing the antitoxic antibody and the toxin are mixed together in vitro, the toxic activity of the exotoxin was neutralized with its immune serum. These great findings results in the establishment of the serum therapy. In 1891, Emil von Behring successfully treated diphtherial patients with immune serum after the Kitasato's advise, and then Behring received the first Nobel prize for his work in serum therapy, and immune serum was recognized as the first agent or medicine to be able to cure intractable diseases.

In 1897, Widal reported the serum of typhus patients agglutinated typhus bacteria. In 1901, Bordet and Gengou developed complement

fixation test using fresh guinea pig serum as complement. In 1906, Wassermann applied the CF test for the diagnosis of syphilis. These steps led to the establishment of serodiagnosis for infectious diseases caused by bacterial and viruses. Therefore, serology started with the discovery of the neutralization of bacterial exotoxin with its antibody by Dr. S. Kitasato in 1889, and serology is a long standing with a history of one century among the biological sciences.

Insoluble problems for serological reactions

Modern sciences have developed remarkably in the last 30 years. Although serology has a history of 100 years, during the last 30 years, however, the principles concerning the measurement of antibody titers by the serological tests have remained almost unchanged. Insoluble problems remain in this field.

For the quantitative analysis of antibody present in patient's serum or immune serum, the general principle of the serological reaction is based on a continuous two-fold stepwise dilution of the sample. What is the reason for or purpose of this continuous two-fold

stepwise dilution of serum? Is it really possible to measure the amounts of antibodies by means of dilution? Is the two-fold increase of antibody titer from 16 to 32-fold really equivalent to the two-fold increase from 128 to 256-fold?

The problem involved in dilution can be explained more concretely using the assay of virus neutralizing antibody in the serum from two patients #1 and #2, as an example. We can assume that the serum samples are identically diluted to 32-fold, one unit volume of the diluted serum samples is mixed with an equal volume of a virus suspension, for example HSV as a model, and allow to neutralize virus. 90% of the virus is neutralized (10% of the virus remain unneutralized) with the serum #1 at the dilution of 32-fold, and 10% of the virus is neutralized (90% is unneutralized) with the serum from the patient #2 at the same dilution of 1:32. In these two cases, the amount of virus remaining unneutralized is absolutely different, i.e. 10% and 90%. However, when the remaining virus is allowed to replicate in cultured cells, the infected cells with the infecting virus which has actively replicated, and then induce the cyto-

pathic effect (cell degeneration). As a result, the neutralizing antibody titer in both sera is evaluated as presumable 1:16 since neutralizing antibodies in both sera could not neutralized the virus at the dilution of 1:32.

Therefore, in the case of the amounts of neutralized virus is 0.1% or 99.9%, the same conclusion would be obtained just like an example of 100% of the virus. The reason of this is that this conventional method only evaluates whether or not unneutralized virus is present qualitatively and does not qualitate the amount of antibody. In spite of this defect, every textbook including the textbooks using in Chiang Mai University and also in my class that antibody titer can be determined by using two-fold stepwise dilutions of serum samples.

Reconsideration of antibody assay method

I am fully aware of the importance of quantitative determination of antibody titers, but I have strong doubt about the principle of antibody titration by means of serum dilution. Is it impossible to assay the precise amount of antibody directly, continuously, and ideally as the

Taguchi F

number of antibody molecules without dilution of the samples ?

There are many substances which bind to IgG or IgM immunoglobulins such as, for example, concanavalin A of lectins, protein A of staphylococcus, rheumatoid factors, antibodies to IgG or IgM and complement. Among these, only complement binds to antibody immunoglobulins which have specifically reacted with its antigen and complement does not bind to intact antibody immune globulins. This indicates that complement can bind only to antigen-antibody complex.

Then, I firstly consider the possibility of the use of an enzyme-labelled complement for this purpose more than 10 years ago.

Complement and complement fixations

As already you know, complement is the complex serum protein with 20 different types of components from C1 to C9. These 20 proteins each react in the correct fashion. When C1 component first binds to antibody molecules fixed on its antigens, a chain reaction as far as C9 occurs on the immune complex. Therefore, if binding of the C1 component can be proven, complement fixation can be represented by the C1 binding reaction alone.

Meanwhile, the complement com-

ponent C1 consists of three subcomponents of C1q, C1r and C1s. The C1q component of complement component C1 first binds to the immune complex. Therefore, I considered first labelled of the C1q with biological active substance such as peroxidase.

The C1q protein is a macromolecule with a molecular weight of about 400,000 which consists of a head portion in the shape of a glove with six fingers and a long handle shaped of a tail portion. Two of the six fingers of one molecule of C1q bind with two molecules of IgG at the site of Fc portion in the C_{H2} domain.

The tail portion of C1q is a very special collagen like protein in which three different peptide chains are united by several S-S bonds. These S-S bonds are presented only in the end of the tail portion. These S-S bonds of C1q are reduced by the treatment with mild reducing reagent and certain enzyme is inserted in the open bond. Hence, it becomes possible to preferential label only the end portion of C1q molecule with the enzyme. As a result, peroxidase labelled C1q (designated as to P*-C1q) was synthesized by binding one molecule of peroxidase to one

molecule of Clq protein.

The use of this active type of P*-Clq as a biological sensor for the detection of immune complex was investigated. I will show you the examples of application of P*-Clq in the measurement of CF antibody and virus neutralizing antibody, and also identification and typing of herpes simplex virus.

A. ELISA-CF

Objective

Since the introduction of CF test in 1901 by Bordet and Gengou, the determination of CF antibody titers has been based conventionally upon the indirect principle that complement is consumed by its binding to antigen-antibody complex

and becomes thereafter unavailable for the hemolysis of sheep erythrocytes by hemolysin. Development of a direct, single-stage CF test acceptable to all investigators has been an ideal yet to be achieved. In view of the fact of sequential binding of complement components, we prepared active enzyme-labelled Clq, which is the first complement component binding to immune complex, and thereby have developed a new CF test system, tentatively designated as ELISA-CF, for the rapid and quantitative determination of CF antibodies to viruses.

Materials and Methods

1. Clq (Figure 1)

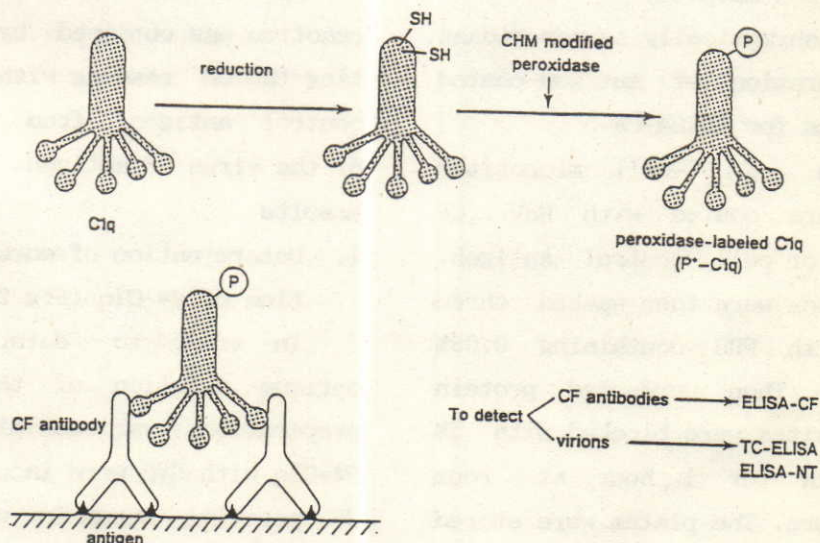


Figure 1 Schematic representation of peroxidase-labelled Clq and its application to diagnosis of viral infections.

Clq subcomponent of component was isolated from goat serum and purified by cation exchange chromatography, and then by gel filtration. The fractions containing Clq protein were reduced with dithiothreitol and allowed to react with horseradish peroxidase which had been modified with maleimide, a cross-linking reagent.

Biological activities of peroxidase-labelled Clq, designated as P*-Clq, were confirmed by demonstrating its functions as follows :

- 1) hemolytic activity as a mixture of P*-Clq and Clq-depleted guinea pig serum to sheep erythrocytes,
- 2) binding affinity for BSA and anti-BSA complex,
- 3) enzymatically as peroxidase.

2. Preparation of antigen-coated plates for ELISA-CF

Wells of 96-well microtiter plate were coated with HSV CF antigen or cell control antigen. The plates were then washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20. Then unreacted protein binding sites were blocked with 5% skim milk for 1 hour at room temperature. The plates were stored at -20°C until used.

3. Procedure of ELISA-CF

Fifty microliters of heat-

inactivated serum samples and an equal volume of P*-Clq were diluted with GVB and then added simultaneously to each well. Positive or negative control sera were always included on all plates. The plates were then incubated for 90 minutes at room temperature. After washing all the wells 3 times with Tween-PBS, 100 microliters of a substrate solution (0.04% ABTS containing 0.175% H₂O₂ in citrated buffer at pH 4.0) were delivered to each well, followed by incubation for 30 minutes at room temperature in the dark. The enzyme reaction was stopped by addition of 0.01% sodium azide. The color developed was measured photometrically at a 414 nm.

The ELISA-CF value for specific reaction was obtained by subtracting the OD reading with the cell control antigen from OD reading of the virus CF antigen.

Results

1. Determination of working dilution of P*-Clq (Fig 2)

In order to determine the optimum dilution of the P*-Clq preparation, various dilution of P*-Clq with GVB were incubated with CF positive serum in wells with HSV. The results are shown in Figure 2 and indicate that a linear relationship between CF titers by

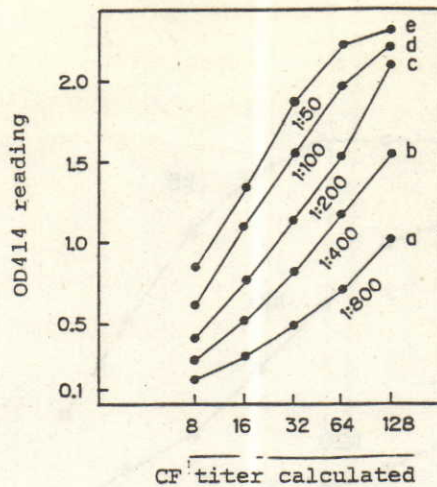


Figure 2 Determination of working dilution of peroxidase-labelled Clq (P*-Clq)

conventional CF test and OD reading by ELISA-CF test was observed primarily at a dilution of 1:200 of the P*-Clq solution. Thus a working dilution of 1:200 was chosen for P*-Clq in subsequent experiments.

With constant concentration of P*-Clq and HSV antigen, the enzyme activity of P*-Clq bound was dependent upon the dilution factors of anti-HSV immune serum. This confirmed the suitability of the P*-Clq for the determination of CF titers of antibodies.

2. Determination of working dilution of HSV antigen (Figure 3)

In order to determine the working dilution of HSV antigen prepared, HSV CF antigen at CF titer of 1:40 was serially diluted

from 1:5 to 1:40. Blocked titration analysis of HSV antigen against CF antibody positive human serum was performed.

Human serum with a HSV CF titer of 1:32 was diluted serially from 1:50 to 1:3200 for each dilution of the antigen. As seen in Figure 3, as the maximum slope of linear regression between OD reading and serum dilution was observed at a dilution of 1:10 of the HSV antigen, for further experiments the dilution of the HSV antigen was fixed at 1:10 for coating plates.

3. Optimum dilution of serum samples (Figure 4)

As shown in Figure 3, most linear color development was obtained when the plates had been

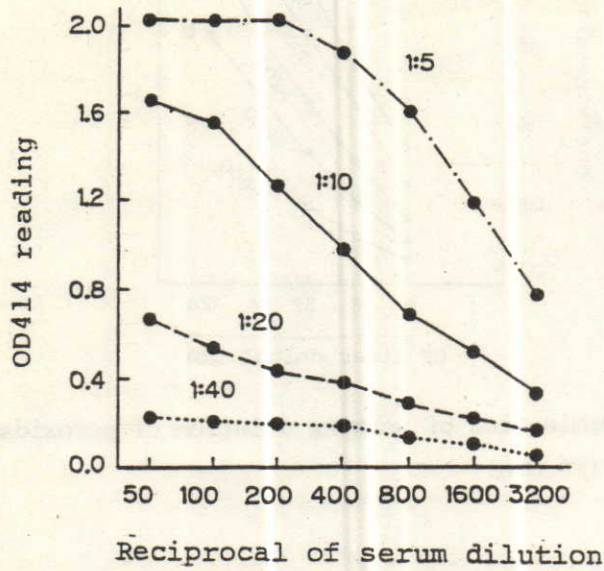


Figure 3 Assessment for optimal dilution of HSV antigen.

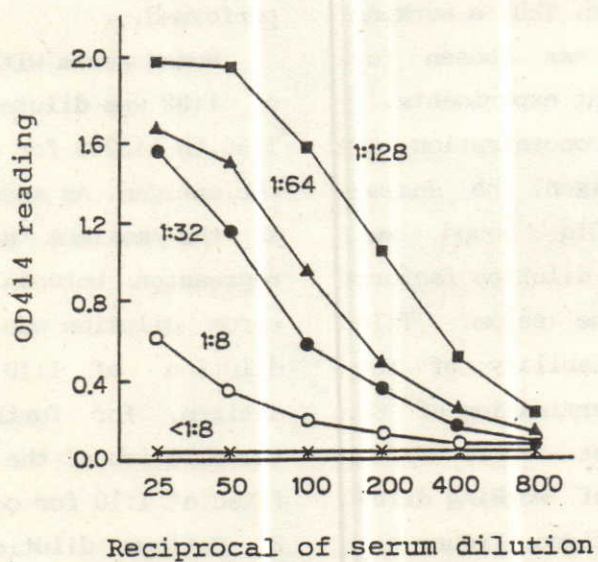


Figure 4 Correlation between dilution and OD reading of antibody-positive sera.

coated with 4 CF units of the HSV antigen and reacted with the P*-Clq at 200-fold dilution.

Then, the optimum dilution of serum samples was determined by comparison of titration curves of human sera with various CF titers to HSV. As shown in Figure 4, virtually linear regression relationships were observed in the case of antibody positive sera from 1:8 to 1:128. On the other hand, no specific reaction was observed with antibody negative serum through the serum dilutions from 1:25 to 1:800 and the color development case at higher serum concentration.

Thus, a dilution factor of 1:50 was considered to be most appropriate for serum dilution.

4. CF titers and OD reading in the detection of antibody to HSV (Figure 5)

Experiments were performed to know the correlation between CF titer and OD reading in the detection of antibody to HSV. The relationship of OD reading in ELISA-CF test to conventional antibody titers was explored in 38 human sera varying in CF titer. With elevation of CF antibody titer plotted as abscissa, as shown in Figure 5, the OD reading showed an increase. These two parameters

were found to have a high degree of direct correlation with a coefficient of 0.94.

5. Relationship of CF titer and OD reading in the detection of antibody to VZV (Figure 6)

ELISA-CF tests were performed on 24 human serum specimens in wells of microplate coated with VZV in the same manner as HSV, and a similar data analysis was made through the sera. Here again, a high degree of direct correlation was noted between CF antibody titer and OD reading with a coefficient of 0.94 although the OD reading showed some variation.

6. Relationship of HI titer and OD reading in the detection of antibody to rubella virus (Figure 7)

We also explored the relationship of OD reading in ELISA-CF test for antibody to rubella virus and conventional HI antibody titers in 24 human sera with various HI titers. The ELISA-CF was carried out on 1:50 dilution of test sera as in the detection of antibody to HSV. As can be seen, their relationship had a coefficient of high as 0.94. However, no detectable color developed in the ELISA-CF with sera having HI antibody titers of 1:32 or lower.

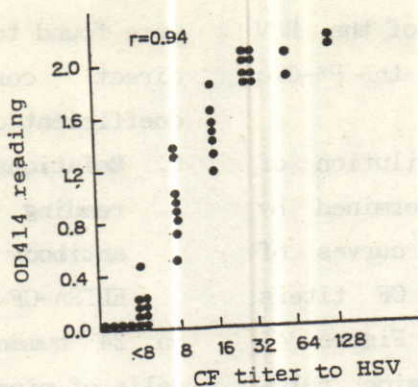


Figure 5 Correlation between CF antibody titer to herpes simplex virus and OD reading

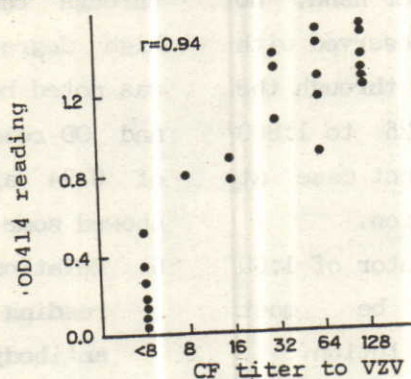


Figure 6 Correlation between CF antibody titer to Varicella-zoster virus and OD reading.

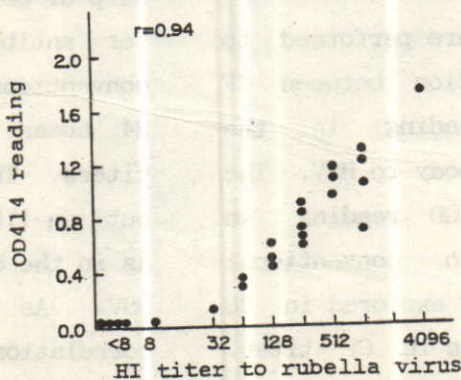


Figure 7 Correlation between HI antibody titer to rubella virus and OD reading.

The good correlation between OD reading in ELISA-CF test and conventional CF or HI antibody titer observed in these studies indicate that the OD reading might be converted to expression in conventional CF antibody titer. In view of this, a standard calibration curve was constructed by plotting ELISA-CF OD reading of reference sera against their known conventional CF antibody titers so that CF antibody titers of test sera, herein after referred to as ELISA-CF titer, could be obtained from OD reading by reference to the standard curve.

7. Relationship of conventional CF antibody titer and ELISA-CF titers (Figure 8)

From OD readings in ELISA-CF tests performed on 40 human sera with different CF titers of antibody to HSV, their ELISA-CF titers were obtained by reference to the standard curve. In Figure 8 showed the results, data obtained with 50-fold dilutions of the sera are represented in Chart A, and those with 200-fold dilutions in Chart B. There was a sharp distinction between sera with CF titers lower than 1:8 and those with 1:8 or higher when the sera were used a 50-fold dilution in the Chart A.

When the ELISA-CF was carried out on sera diluted 200-fold, nevertheless, usual subtle differences in antibody titer by the conventional CF test were noted to be expressed as more obvious difference in ELISA-CF titer.

The correlation coefficient therefore at serum dilution of 50 or 200-fold were 0.95 and 0.97, respectively. The ELISA-CF titer obtained from the standard curve showed a concordance rate of 83% with the conventional CF titer at a serum dilution of 1:50 in the Chart A, and 75% at a serum dilution of 1:200. Furthermore, there were no 2-fold or greater discrepancies in antibody titer between conventional CF and ELISA-CF at serum dilution of 1:50.

The data heretofore presented demonstrate that, by reference to a standard calibration curve, an OD reading in ELISA-CF can be converted to an expression in conventional CF antibody titer and that, for a serum showing a conventional CF titer of 1:16 for example, a titer in finer detail between 1:12 and 1:24 is obtained by ELISA-CF.

8. Virus specificity of the reaction in ELISA-CF

An attempt was made to ascertain whether the antibody

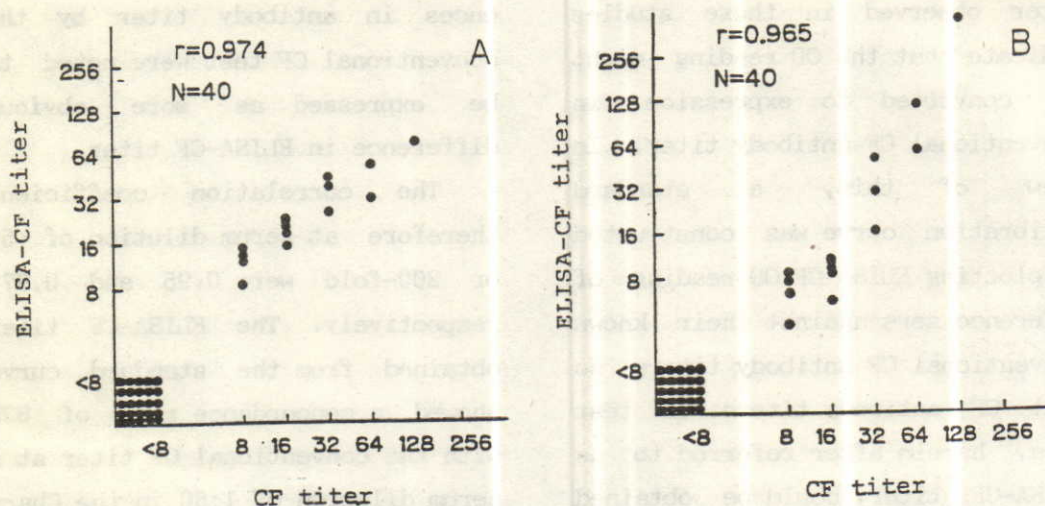


Figure 8 Correlation between CF antibody titer to herpes simplex virus and ELISA-CF titer.

detection by ELISA-CF might be specific of viral antigen. Wells coated with HSV, VZV or CMV were set up, and ELISA-CF tests of sera with known CF titers of 1:8, 1:16 or 1:64 to HSV and free of antibody to the other two viruses were run on these wells to explore virus specificity of the reaction. The test included a serum with a CF titer of 1:64 to VZV and a serum with a titer of 1:64 to CMV. As

seen in Figure 8, the sera positive for CF antibody to HSV showed reactions with HSV alone, hence no cross-reaction with the other viruses.

The present investigation has thus demonstrated the ELISA-CF to be a new test system for quantitative detection of antibody to virus, particularly of CF antibody, in the serum of patients with viral infections.

B. ELISA TC-ELISA

Objective

We have devised a simple method for rapid identification and serotyping of HSV using commercially available anti-HSV immune sera, hereinafter referred to a TC-ELISA. This presentation briefly describes the new assay system.

Materials and Methods

1. Materials

(1) The 2 laboratory reference strains, HF and McIntyre, were used as type 1 standard strains. As type 2 standard strains, strain 196 and UW-268 were employed. Besides 8 HSV type 1 clinical isolates and 14 type 2 isolates were also tested. All these strains had been typed according to cleavage pattern of viral DNA with restriction enzymes as well as by immunofluorescence with monoclonal antibodies to HSV.

(2) Commercially available immune sera to HSV were employed in this study. The anti-HSV type 1 serum was a product of Denka Seiken, for CF test, prepared in guinea pigs. It had a CF antibody titer of 1:64. The anti-HSV type 2 immune serum was obtained from Dako immunoglobulins, Copenhagen; it was a rabbit antiserum for neutralization test. The serum had a neutralizing antibody titer of 1:1024

against homologous type 2 virus and titer of 1:256 against heterologous antigen.

2. Principle of TC-ELISA

HSV is propagated, for amplification of viral antigens, over a short duration in Vero cells grown in 96-well microtiter plates. The infected cells are fixed with methanol as soon as a mild degree of CPE has appeared. The test system is based on the principle that HSV antigens are detected and quantitated by one-step ELISA-CF test by incubation with simultaneously added commercial anti-HSV polyclonal immune serum and peroxidase-labelled Clq.

3. Procedure of TC-ELISA

(1) HSV is inoculated onto Vero cells.

(2) The plate is incubated at 37 °C for 24 hours or longer, if necessary.

(3) As the cells have become to exhibit a 10% or greater CPE, they are fixed with methanol.

(4) 50 microliters of anti-HSV immune serum and an equal volume of P*-Clq solution are then pipetted directly into each well without prior blocking treatment, and the plate is incubated for 60 minutes.

(5) 100 microliters of a color-genic substrate solution (ABTS) are

delivered to each well, followed by a further 60 minutes incubation.

(6) The enzymatic activity of P*-Clq bound is measured photometrically with an Immuno Reader at a wavelength of 414 nm.

(7) The absorbance of the mixture in the well of uninfected cells is subtracted from that of the mixture in the well of virus infected cells to obtain the viral antigen specific reaction.

Results

1. Working dilution of anti-HSV immune serum (Figure 9)

Cultures of Vero cells were

incubated with 100 PFU/well of the HF strain of HSV type 1 and incubated for 24 hours. As 40 to 60% CPE developed in the cultures, appropriate dilutions of antiserum to HSV-1 and HSV-2 were added respectively to wells and the OD reading of each well content was determined.

This picture shows typical results of experiment. From these data it was concluded to adopt a dilution factor 1:15 for Denka anti-HSV-1 and a dilution factor of 1:100 for Dako anti-HSV-2 immune serum in subsequent experiments.

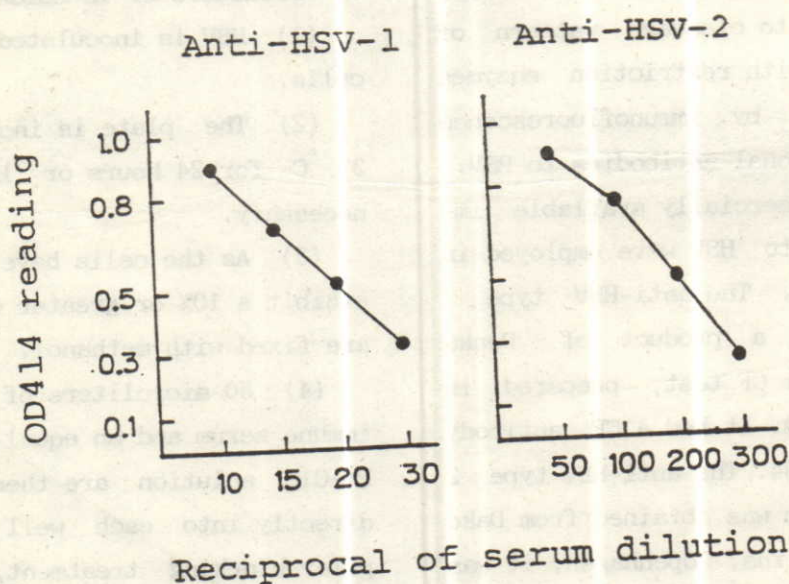


Figure 9 Working dilution of anti-HSV immune sera.

2. Detection of HSV antigen by TC-ELISA (Table 1)

Cultures of Vero cells and MRC-5 cells were inoculated with 100 PFU/well of HSV-1 HF strain of HSV-2 strain 196, followed by incubation for 24 and 72 hours, respectively. Typical findings are presented in this slide.

As seen in column B of this slide, uninfected cell controls showed OD reading of 0.23 or lower. Viral controls of both Vero cells and MRC-5 cells with pronounced CPEs produced by VZV, CMV, measles virus, and mumps virus showed OD reading of less than 0.3. hence essentially the same as the

uninfected cell controls.

As seen in column A, a remarkably intense color of 10 or greater OD reading developed with antisera, whether anti-HSV-1 or anti-HSV-2, in cultures infected with HSV-1 HF strain. In cultures of cells infected with HSV-2, on the other hand, OD readings greater than 1.0 were obtained with anti-HSV-2 immune serum. But OD readings were as low as less than 0.37 with anti-HSV-1 immune serum.

The difference in absorbance, that is, intensity of coloration was so obvious that they could be readily appreciable with the naked eye.

Table 1 OD reading of reaction of HSV antigen by TC-ELISA.

Virus	Host cell	with anti-HSV-1 serum			with anti-HSV-2 serum		
		(A)	(B)	(A-B)	(A)	(B)	(A-B)
HSV-1	Vero	1.19	0.23	0.96	1.34	0.21	1.13
(HF)	MRC-5	1.03	0.13	0.89	1.09	0.10	0.99
HSV-2	Vero	0.35	0.12	0.12	1.00	0.15	0.85
(196)	MRC-5	0.37	0.13	0.24	1.22	0.10	1.12
VZV	Vero	0.27	0.27	0	0.21	0.18	0.03
CMV	MRC-5	0.06	0	0.06	0	0	0
Measles	Vero	0.30	0.23	0.07	0.23	0.15	0.08
Mumps	Vero	0.29	0.23	0.06	0.21	0.15	0.06

A = Virus infected cell; B = Control cell, A - B = Specific reaction;

Anti-HSV-1 serum : Denka, 1:15

Anti-HSV-2 serum : Dako, 1:100

The data presented in Table 1 suggested applicability of the TC-ELISA system for specific detection of HSV by using Dako anti-HSV-2 immune serum, and for simple differentiation of type 1 from type 2 HSV with the use of Denka anti-HSV-1 immune serum.

2. Comparison of HSV types 1 and 2 in TC-ELISA (Table 2)

Reactivity of HSV with immune sera to HSV-1 and HSV-2 was assessed by TC-ELISA. The OD reading of uninfected cell controls showed some inter-assay variations. In view of this, the HSV types 2/1 reactivity index was calculated by dividing the OD reading of wells

with anti-HSV-2 immune serum by that of wells with anti-HSV-1 immune serum.

Using this index as a parameter, we compared reactivity with antisera in TC-ELISA between type 1 and type 2. The type 2/1 index of OD reading of the uninfected cell controls was consistently between 0.6 and 1.0. Cultures infected with the HF strain and MacIntyre of HSV-1 showed invariable indices of 2.1 or lower in all instances, whereas the index was usually 3.5 or higher and in no instance below 3.0 in cultures infected with HSV-2 reference strains.

Thus the experiments demon-

Table 2 Comparison of HSV index* with commercial antisera in TC-ELISA between HSV type 1 and type 2

Virus	Vero cells		MRC-5 cells		Index Range**
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	
HSV-1 : HF	1.4	1.5	0.8	1.1	0.8-1.5
MacIntyre	2.1	2.1	1.7	1.8	1.7-2.1
HSV-2 : 196	4.1	3.5	3.6	4.7	3.5-8.6
UW-268	3.5	3.0	3.0	4.8	3.0-4.8
Cell control	0.8	0.6	1.0	0.8	0.6-1.0

* Index = OD with anti-HSV-2 serum/OD with anti-HSV-1 serum

** Range of values obtained for the index in 10 replicate determination.

strated that typing of the laboratory strains of HSV might be feasible by the TC-ELISA system employed the Denka and Dako immune sera.

4. Typing of HSV clinical isolates by TC-ELISA (Table 3,4,5)

Typical results of tests run in duplicate are presented in this slide. All HSV-1 isolates exhibited remarkably proximate indices, being invariable 2.1 or lower as was the case of the HSV-1 reference laboratory strains.

As can be seen in the next slide, the index was 3.1 or higher for all clinical isolates of HSV-2 but varied considerably among these isolates, compared to the HSV-1 isolates.

The difference in intensity of color developed between the types of the virus was so distinct that it could be readily noted with the naked eye, prior to photometric determinations.

Table 3 Typing of HSV by TC-ELISA with commercial immune sera.

Virus	Index 1	Index 2	Range
Non-infected cells	0.8	0.6	0.6-0.9
Laboratory strains			
HSV-1 HF	1.4	1.2	
MacIntyre	2.1	1.8	0.6-2.1
HSV-2 196	4.1	8.3	
UW-268	3.5	4.8	3.5-8.4
Clinical isolates			
#104	1.4	1.8	
#153	1.5	1.6	
#212	1.4	1.6	
#264	1.5	1.5	
#265	1.7	2.0	
#287	1.7	1.6	
#289	1.6	1.5	
#377	1.9	1.8	1.4-2.1

* All HSV type 1 was identified by restriction endonucleases.

Table 4 Typing of HSV by TC-ELISA with commercial immune sera.

Virus		Index 1	Index 2	Range
Non-infected cell		0.8	0.6	0.6-0.9
Laboratory strains				
HSV-1	HF	1.4	0.6	
	MacIntyre	2.1	1.8	0.6-2.1
HSV02	196	4.1	8.3	
	UW-268	3.5	4.8	3.5-8.4
Clinical isolates*				
	YNO	5.6	3.7	
	YMS	7.1	3.1	
	MA	3.8	3.5	
	IBI	4.7	4.0	
	MD	6.2	NT	
	NEA	5.9	NT	
	NEB	6.0	NT	
	K29	7.1	NT	
	UD5	5.2	NT	
	UD112	4.6	NT	
	MS-1325	8.3	31.5**	CPE 30%
	MS-1420	6.5	31.2**	CPE 30%
	MS-1437	7.3	9.7	
	MS-1476	7.2	8.3	3.1-31

* All these isolates were HSV type 2 as determined by viral DNA cleavage pattern with restriction enzyme and also by immunofluorescent microscopy with HSV type specific monoclonal antibody.

Table 5 Relationship between type 2/type 1 index and HSV serotype.

	Index range
Non-infected cell control	0.6-0.9
HSV-1 : 2 Laboratory strains	0.6-2.1
8 Clinical isolates	1.4-2.1
HSV-2 : 2 Laboratory strains	3.5-8.4
14 Clinical isolates	3.1-31

Table 6 Detection limit of HSV by TC-ELISA.

Virus dose		Incubation period (hours)		
PFU/ml	PFU/well	24	48	96
1000	50	+	+	+
500	25	+	+	+
100	5	-	+	+
20	1	-	+	+
10	0.5	-	-	±
2	0.1	-	-	±

5. Lower limit of sensitivity of TC-ELISA in the detection of HSV (Table 6)

Experiments were conducted to explore the lower limit of sensitivity of TC-ELISA for detection of HSV. Results of TC-ELISA performed on the plates are summarized in Table 6.

Cultures of cells infected with 500 PFU/ml (equivalent to 25 PFU/well) of HSV and incubated for 24 hours showed positive reactions. When incubated for 90 hours after inoculation with 20 PFU/ml (equivalent to 1 PFU/well), cultures also showed positive tests.

These findings indicate that

Table 7 Characteristic advantages of TC-ELISA

-
- | | |
|-----------------|--|
| 1. Rapid | : Virus antigen amplification for 24 hours,
and identification & typing for 3 hours |
| 2. Simple | : Commercial immune serum, no blocking treatment,
one-stage ELISA |
| 3. Sensitive | : 20-400 PFU/ml for 24-96 hour incubation periods |
| 4. Specific | : HSV specific, no cross reaction to VZV or CMV |
| 5. Reproducible | : Remarkably good |
-

detection and typing of HSV can be accomplished by TC-ELISA in so far as cells are inoculated with a minimum of 1 PFU of HSV per well.

Summary and Conclusion

This new TC-ELISA system employing P*-Clq and commercially available antisera to HSV has the advantages of facilitating detection of an extremely small amount HSV, for example, 20 PFU/ml and of rapid measurement of neutralizing permitting both identification and typing if HSV simultaneously with commercial immune sera by a procedure that can be complete within 3 hours. (Table 7)

The TC-ELISA system we have developed is applicable also for rapid detection and identification

of non-cytopathic viruses such as rubella virus, AIDS causing virus, as well as for a rapid measurement also non-cytopathic viruses. Thus the assay system has potential usefulness as a rapid diagnostic test for viral infections.

This paper was presented at the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University as a special lecture of academic cooperation between Kitasato University, School of Hygienic Sciences and Chiang Mai University, Faculty of Associated Medical Sciences, May 18, 1989.

นิพนธ์ต้นฉบับ

คอมพิวเตอร์ช่วยสอน : โปรแกรมคอมพิวเตอร์

เพื่อเสริมความเข้าใจในการแปลผลทางห้องปฏิบัติการขั้นสูง

ประสิทธิ์ ชะวรัตน์* และ นันทยา ชะวรัตน์**

บทคัดย่อ คอมพิวเตอร์ ได้มีบทบาทในระบบการศึกษาเป็นอันมาก รายงานนี้ ได้นำคอมพิวเตอร์มาช่วยสอน (Computer Aided Instruction, CAI) หรือ คอมพิวเตอร์มาช่วยในการเรียน (Computer Assisted Learning, CAL) ของนักศึกษา คอมพิวเตอร์จะมีส่วนช่วยในการเสริมการสอนของครู และการเสริมความเข้าใจของนักศึกษา รายงานนี้ ได้พัฒนาโปรแกรมเพื่อช่วยในการเรียนการสอนและการแปลผลทางห้องปฏิบัติการทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory Interpretation) เกี่ยวกับความผิดปกติของการตรวจวัดระดับอิเล็กโตรไลต์ ในผู้ป่วย เป็นตัวอย่าง ซึ่งโปรแกรมนี้ ได้เขียนขึ้นด้วยภาษาเบสิก และทำงานบนเครื่องตระกูล IBM-PC compatible 16 บิต ขนาดความจุ 640 K ตัวอย่างโปรแกรมที่สร้างขึ้นนี้ สามารถให้นักศึกษาได้ทดสอบความเข้าใจของตนเอง และหากเข้าใจไม่ถูกต้อง คอมพิวเตอร์ก็จะแสดงผล และคำอธิบายประกอบ โปรแกรมตัวอย่างนี้สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการเรียน การสอนกระบวนวิชาอื่นๆ ได้อีกด้วย (คำรหัส : คอมพิวเตอร์, อิเล็กโตรไลต์) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 23 ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน 2533 หน้า 141-147

* ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ** ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**Abstract Computer Aided Instruction : Computer Program of
Enhanced Understanding in Clinical Laboratory Interpretation.
Chanarat P and Chanarat N.**

At present, computer had a role in educational system. The purpose of this report is to introduce Computer Aided Instruction (CAI) or Computer Assisted Learning (CAL) for enhanced understanding in interpretation of acid-base disturbance. This computer program was developed in BASIC language and run on IBM-PC compatible 16 bit, 640K. The proposed program could be performed a self test for student and could be shown its comment when answer was incorrect. This program could be applied and modified for teaching in another clinical laboratory interpretation. (Keyword : Computer, Electrolytes) Bull Chiang Mai AMS 1990; 23: 141-147.

คอมพิวเตอร์ได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการศึกษา
สำหรับสถาบันการศึกษา ได้นำคอมพิวเตอร์มาช่วย
ช่วยงานการวิเคราะห์ทางสถิติ สำหรับงานวิจัย
ต่างๆ และงานการสืบค้นข้อมูลต่างๆ งานในห้อง
สมุด มีส่วนช่วยงานการบริหาร เช่น การจัด
ทำข้อมูลนักเรียนนักศึกษา ข้อมูลของอาจารย์และ
บุคลากรต่างๆ นอกจากนั้น ยังได้มีการนำคอมพิ
เตอร์มาช่วยงานการเรียนการสอนเพิ่มขึ้นอีกด้วย

คอมพิวเตอร์ช่วยสอน (Computer Aided
Instruction, CAI)^(1,2) มีคำทำช้อยู่ใน
ปัจจุบัน ได้แก่

CAB = Computer Administered Educa-
tion

CAT = Computer Aided teaching

CAE = Computer Assisted Education

CAL = Computer Assisted Learning

ส่วนคำที่นิยมใช้กันมาก คือ CAI และ CAL
บทบาทของ CAI หรือ CAL จะเป็นลักษณะการ

เสนอบทเรียน ให้นักศึกษาได้อ่านข้อความต่างๆ
โดยให้นักศึกษาได้การสนองตอบ เช่น มีการ
ตอบคำถาม หากไม่เข้าใจก่อนจะห้ ก็จะมีคำอธิบาย
เพื่อให้เกิดความเข้าใจกระจ่างขึ้น มีการให้
คะแนนในการตอบ มีการวิเคราะห์ส่วนที่บกพร่อง
บางสถาบันการศึกษา สามารถที่จะพัฒนาการสอน
โดยนำคอมพิวเตอร์มาช่วยงานการสอนเสริม หรือ
นักศึกษาอาจจะมาศึกษาด้วยตนเอง เพื่อเป็นการ
เสริมหลักสูตร เป็นความเข้าใจนอกเหนือจากที่
ได้รับฟังการบรรยายในชั้นเรียนแล้ว

การเรียนการสอน ในสาขาวิชาเทคนิคการ
แพทย์ อันได้แก่ การสอนทางโลหิตวิทยา จุล
พระศาสตร์คลินิก เคมีคลินิก จุลชีววิทยาคลี
นิก และภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก บางรายวิชา เพื่อ
ความกระจ่างงานการเข้าใจผลของการตรวจทาง
ห้องปฏิบัติการซึ่งมีหลายการทดสอบร่วมกัน ทำให้
เข้าใจ ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการทดสอบต่างๆ
รายงานนี้จึงได้นำเสนอวิธีการหนึ่ง โดยนำคอม

พิวเตอร์มาช่วย ในการเสริมการเรียนรู้ของนักศึกษา ซึ่งสามารถที่จะพัฒนาได้ด้วยตนเอง โดยวิชา ภาษาคอมพิวเตอร์ที่ไม่ยากนัก และอาจจะนำไป ประยุกต์ใช้กับกระบวนวิชาอื่นๆ ได้ด้วย

วิธีการ

ได้ใช้ข้อมูล และคำอธิบายผลการตรวจทาง ห้องปฏิบัติการของการตรวจวิเคราะห์โลหิต อันได้แก่การตรวจวิเคราะห์ระดับ Na , K , Cl , TCO_2 , pH , H^+ , pCO_2 , pO_2 , HCO_3 , Urea, Creatinine, Anion gap และ Lactate เป็นหลัก และใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยเป็นข้อมูลในการศึกษา(๖) โดยได้สร้างผังงาน (Flow chart) เพื่อการนำไปเขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อไป ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 ส่วนโปรแกรม ได้พัฒนาเขียนขึ้นด้วยภาษาเบสิก และทำงานบนเครื่อง IBM-PC compatible ขนาด 16 บิต ดังรายละเอียดของโปรแกรมในตารางที่ 1

ผลการทดลอง

เมื่อ Load program ACID-BASE เข้าไปบนเครื่องแล้ว ให้ใช้คำสั่ง RUN ก็จะได้ปรากฏ เป็นประวัติของผู้ป่วยรายที่ 1 ขึ้นบนจอภาพ ตามแผนภาพที่ 2 พร้อมกับผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการต่างๆ จากนั้น ให้นักศึกษาตอบคำถามว่าการตรวจที่ได้นี้เกิดจากสาเหตุใดจากคำตอบที่กำหนดให้ คือ (A) (B) (C) (D) หรือ (E)

หากนักศึกษาตอบได้ถูกต้อง ดังตัวอย่างที่ 1 คอมพิวเตอร์จะแสดงให้ทราบ โดยปรากฏคำว่า YOU ARE RIGHT ขึ้นมา และหากตอบผิด ดังตัวอย่างที่ 2 ก็จะได้ปรากฏคำว่า YOU ARE WRONG ขึ้นมา และเครื่องจะถามว่า ต้องการดูคำอธิบายหรือไม่ ถ้าหากต้องการก็ให้พิมพ์ Y เครื่องก็จะแสดงคำอธิบายขึ้นมาให้ดู ดังตัวอย่างที่ 2

วิจารณ์

คอมพิวเตอร์ช่วยสอน มีใช้เป็นของจำพวก

วงการคอมพิวเตอร์ แต่การนำมาใช้ในงานการศึกษา เทคนิคการแพทย์ยังไม่แพร่หลายนัก รายงานนี้พยายามที่จะให้เป็นต้นแบบ ผู้ที่สนใจ สามารถที่จะนำหลักการและวิธีการไปประยุกต์ใช้ได้ ภาษาที่ใช้ ได้เลือกภาษาเบสิก ซึ่งเป็นภาษาที่ง่ายแก่ การเข้าใจ การเขียนโปรแกรมไม่ยุ่งยาก ถึงแม้ว่าการทำงานจะช้ากว่าภาษาอื่น แต่ก็เหมาะที่จะนำมาใช้สำหรับการโต้ตอบกับผู้เรียน

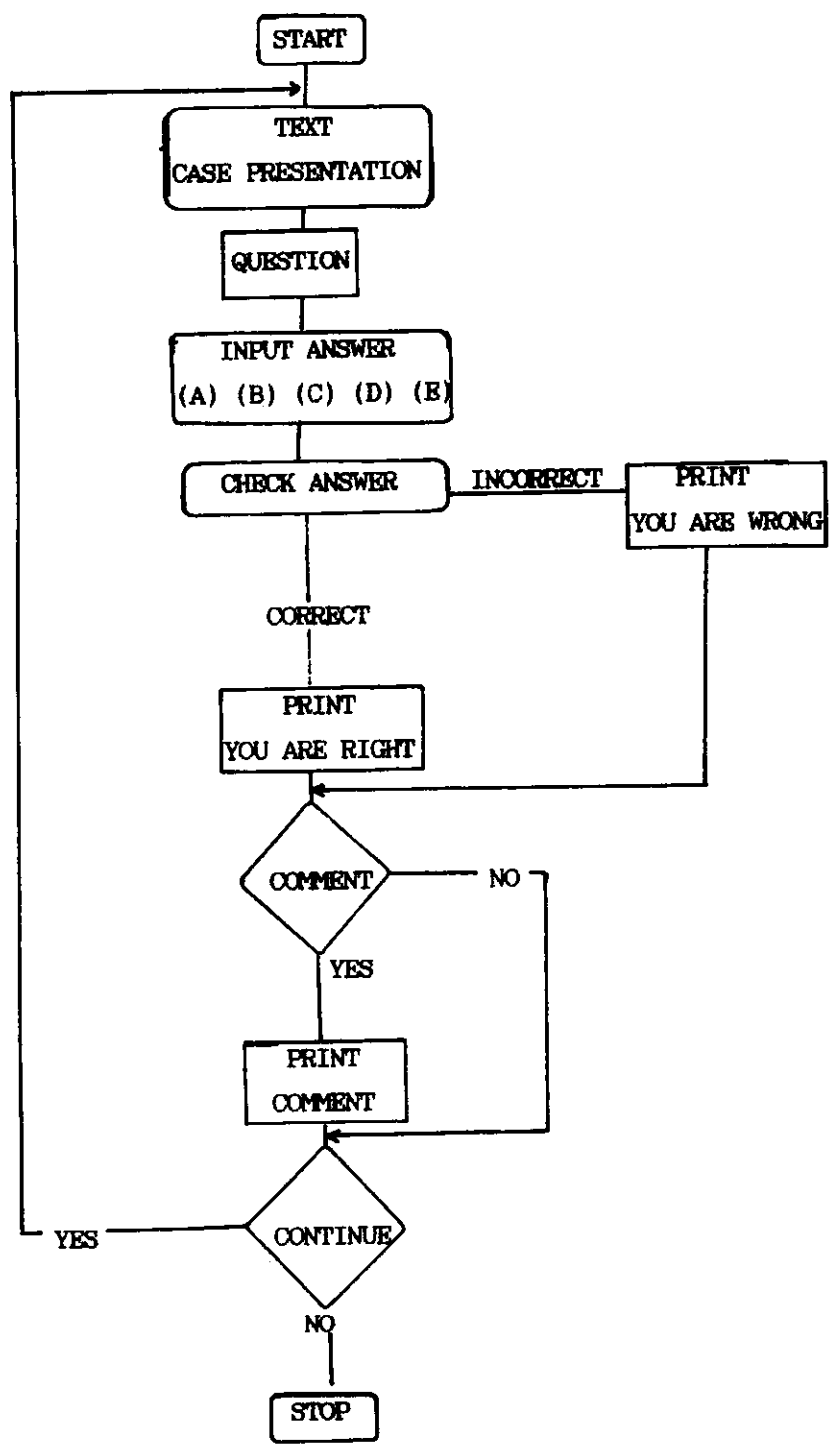
ในหลักการแล้ว การใช้คอมพิวเตอร์ช่วยสอน มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการช่วยเสริมการสอนและเสริมความเข้าใจของผู้เรียน มิได้เป็นการนำมาใช้แทนครูผู้สอน เนื่องจากความจำเป็นของครูผู้สอนยังมีอยู่มาก

ได้มีการพัฒนา CAI เพื่อนำไปสู่ Artificial Intelligence (AI) หรือปัญญาประดิษฐ์ เพื่อที่จะตอบปัญหา และเลือกสรรบทเรียนต่างๆ ให้เหมาะกับผู้เรียน เพราะ CAI ที่ใช้อยู่ในขณะนี้ เป็นโปรแกรมสำเร็จงานลักษณะ บทเรียนสำเร็จรูป โดยยังไม่สามารถที่จะจัดบทเรียนให้เหมาะสมกับผู้เรียนได้ แต่ในอนาคตอันใกล้ มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปสู่ระบบ ICAI (Intelligence Computer Aided Instruction) ซึ่งเป็นระบบผู้เชี่ยวชาญ (Expert System) ได้

อุปสรรคสำคัญของ CAI คือ

(1) จำนวนของคอมพิวเตอร์ที่จะนำมาใช้สำหรับผู้เรียน สถานการณ์การศึกษา จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีความคอมพิวเตอร์ จำนวนที่พอเหมาะกับจำนวนนักศึกษา จึงจะทำให้ CAI พัฒนารุดหน้าไปได้

(2) โปรแกรมบทเรียน ในขณะนี้ เรายังมีโปรแกรมบทเรียนไม่มากนัก และกระบวน การเรียนการสอนด้วยคอมพิวเตอร์ ยังไม่แพร่หลาย ผู้พัฒนาบทเรียน จึงจำเป็นต้องมี ความรู้ 3 ประการประกอบกันคือ



แผนภาพที่ 1 ผังงานการสร้างโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 1 รายละเอียดของโปรแกรม

```

10 REM ACID - BASE REVIEW
20 CLS
21 PRINT " "
25 PRINT " ACID-BASE DISORDER REVIEW
   DEVELOPED BY
   P. AND N. CHANARAT"
30 PRINT " *****"
31 PRINT " "
40 PRINT " CHOOSE THE CORRECT ONE"
50 PRINT " 1. A 80 year Thai old man with a long history of duodenal
   ulceration presented in a shocked state due to massive
   bleeding into his gut. On admission his systolic BP was"
61 PRINT " 70 mm Hg and his biochemical profile was as follows :
   PLASMA (mmol/L)          BLOOD
   Na 139 (132-144)         pH 7.35 (7.35-7.45)
   K 4.8 (3.2-4.8)          H+ 125 nmol/L (35-45)
   Cl 98 (98-108)           pCO2 25 mmHg (35-45)
   TCO2 5 (23-33)           pO2 151 mmHg (80-110)
   Urea 24.0 (3.0-8.0)      HCO3 5 mmol/L (23-33)
   Creat. 0.30 (0.06-0.12)
   ADap 40 mEq/L (7-17)
   Lactate 28.0 (<2.0)"
64 PRINT " "
65 PRINT " "
70 PRINT " A. severe lactic acidosis
   B. high anion gap metabolic acidosis
   C. Type A lactic acidosis"
71 PRINT " D. hypoxia
   E. all of the above"
80 PRINT " *****"
90 INPUT " YOUR ANSWER IS (A), (B), (C), (D) OR (E)";M9
91 IF M9 = "A" THEN GOTO 130
92 IF M9 = "B" THEN GOTO 120
93 IF M9 = "C" THEN GOTO 120
94 IF M9 = "D" THEN GOTO 120
95 IF M9 = "E" THEN 100
100 PRINT " YOU ARE RIGHT"
110 GOTO 130
120 PRINT " YOU ARE WRONG"
130 INPUT " DO YOU WANT TO SEE COMMENT ? TYPE 'Y' OR 'N';A9
140 IF A9 = "Y" THEN GOTO 149
141 IF A9 = "N" THEN GOTO 160
149 PRINT "*****"

150 PRINT " COMMENT :- This is a patient of severe lactic acidosis
   resulting from poor tissue perfusion due to
   shock. A possible cause of high anion gap is"
161 PRINT " renal failure. The normokalemia in this patient
   with severe acidemia reinforces the patient that
   acidemia due to the distribution has little"
162 PRINT " effect on the distribution of potassium ions
   between the intra- and extracellular fluids."
153 PRINT " THE ANSWER IS 'E'"
160 INPUT " DO YOU WANT TO CONTINUE ? TYPE 'Y' OR 'N';B9
170 IF B9 = "Y" THEN GOTO 176
175 IF B9 = "N" THEN GOTO 1000
176 CLS
180 PRINT "2. The following laboratory values are those of an 80 year
   old Thai man who presented in status epilepticus. On
   admission he was severely distressed and cyanosed."
181 PRINT " PLASMA (mmol/L)          BLOOD
   Na 145 (132-144)         pH 7.35 (7.35-7.45)
   K 6.8 (3.2-4.8)          H+ 115 nmol/L (35-45)
   Cl 102 (98-108)          pCO2 63 mmHg (35-45)
   TCO2 13 (23-33)          pO2 101 mmHg (80-110)
   Urea 10.5 (3.0-8.0)      HCO3 13 mmol/L (23-33)
   Creat 1.10 (0.06-0.12)
   ADap 37 mEq/L (7-17)
   Lactate 23.5 (<2.0)"
185 PRINT " *****"
190 PRINT " A. renal disease
   B. urea and creatinine should be repeated
   C. mixed metabolic and respiratory acidosis"
191 PRINT " D. type B lactic acidosis
   E. none of the above"
200 PRINT " *****"
201 INPUT " YOUR ANSWER IS (A), (B), (C), (D) OR (E)";M8
210 IF M8 = "A" THEN GOTO 250
215 IF M8 = "B" THEN GOTO 250
220 IF M8 = "D" THEN GOTO 250
225 IF M8 = "E" THEN GOTO 250
226 IF M8 = "C" THEN GOTO 252
250 PRINT " YOU ARE WRONG"
251 GOTO 260
252 PRINT " YOU ARE RIGHT"
253 GOTO 260
260 INPUT " DO YOU WANT TO SEE COMMENT ? TYPE 'Y' OR 'N';C9
270 IF C9 = "N" THEN GOTO 1000
280 PRINT "*****"
300 PRINT " COMMENT :- The lactic acidosis in this patient is due to
   tissue hypoxia resulting from the fit and
   respiratory failure - the blood gases reveal"
301 PRINT " a mixed respiratory and metabolic acidosis.
   The hyperkalemia probably results from the
   severe tissue hypoxia."
302 PRINT " THE ANSWER IS 'C'"
1000 END

```

แบบขอรับเป็นสมาชิก วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ที่

วันที่

ถึง บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ข้าพเจ้า ยินดีขอรับเป็นสมาชิก วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ โปรดจัดส่งวารสาร
ถึงข้าพเจ้า ดังนี้

นาม สำนักงาน

..... บ้านเลขที่

ถนน ตำบล

อำเภอ จังหวัด

ข้าพเจ้า ได้ส่งเงินจำนวน บาท สำหรับเป็นค่าบำรุงสมาชิก
☐ รายปี ☐ ตลอดชีพ ส่งจ่ายนามเพื่อบริการวารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
 บพ. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาพร้อมกับแบบฟอร์มนี้แล้ว

ลงชื่อ

หมายเหตุ	ค่าบำรุงสมาชิกรายปี	60 บาท
	ค่าบำรุงสมาชิกตลอดชีพ	500 บาท

การจำแนกไมโครคอมพิวเตอร์ในงานการพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อ Enterobacteriaceae

วรายวิทย์ เกตราไชยอนันต์ มารศรี ภารารจนาพันธ์ และ ประสิทธิ์ ธาวาจิติกุล

บทคัดย่อ รายงานนี้ ได้ศึกษาการพิสูจน์แยกชนิด (Identification) ของเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae โดยหยดเชื้อที่ขุ่นน้ำเกลือลงในหลุมของ microtiter plate ที่มีรายการทดสอบทางชีวเคมี 12 ชนิด หลังจากการอุ่นเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แปลผลที่ได้ด้วยโปรแกรมไมโครคอมพิวเตอร์ "COMENTBACM" ซึ่งวิธีการพิสูจน์ทำได้รวดเร็ว ให้ผลสอดคล้องกันจำนวน 134 จาก 150 รายของเชื้อที่แยกได้ (89.33%) (คำรหัส : ไมโครคอมพิวเตอร์, Enterobacteriaceae) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 23 ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน 2533 หน้า 149-154

Abstract Rapid Identification of Enterobacteriaceae by Microcomputer and Microbiochemical Methods. Pettrachaiant V, Krairojanant M and Tharavichitkul P.

Rapid identification of Enterobacteriaceae could be performed by suspending the organism in sterile normal saline and dropping into each well of microtiter plate which contained of 12 biochemical tests. After 4 hours of incubation, the biochemical results were interpreted by microcomputer program "COMENTBACM". The program was developed under dBase III plus. It was revealed that this rapid microbiological method gave the correct identification of 134 from 150 isolates (89.33%). (Keyword : Microcomputer, Enterobacteriaceae) Bull Chiang Mai AMS 1990; 23: 149-154

ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) ของนายวรายวิทย์ เกตราไชยอนันต์
* ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ ** หน่วยปฏิบัติการกลาง คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เรา นี้ ได้มีการนำการทดสอบทางชีวเคมี (เช่น) เข้ามาใช้ในการพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae นอกจากนั้นยังมีเทคนิคอื่นๆ ซึ่งให้ความแม่นยำในการพิสูจน์เชื้อ ได้แก่วิธี Antibiotic susceptibility patterns, Species specific bacteriophages, DNA-DNA hybridization เป็นต้น เทคนิคเหล่านี้ ทำให้สามารถแยกเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ออกเป็น genera, species และ biogroup ได้มากมาย ในปี ค.ศ. 1970 Rapka^(1,2) ได้นำเอาไมโครคอมพิวเตอร์เข้ามาใช้ในการช่วยวิเคราะห์และเก็บข้อมูลทางจุลชีววิทยา ต่อมาได้มีการปรับปรุงโปรแกรม เพื่อให้ได้วิธีการวินิจฉัยที่รวดเร็ว⁽³⁾ การทดสอบทางชีวเคมีในต่างประเทศ ได้นิยามชุดนํ้ายาสำเร็จรูป (Kit) ได้แก่ API 20E, Micro ID, Enteri tek, Entertube II, Microdilution system, Minetek⁽⁴⁾ แต่อาหารเลี้ยงเชื้อ และนํ้ายาสำเร็จรูปเหล่านี้มีราคาแพงมากเกินไปที่จะซื้อหามาใช้ได้งานประจำวันในประเทศไทยของเราได้ การศึกษานี้ จึงทำเพื่อพิสูจน์เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นเอง และทำการทดสอบโดยวิธีรวดเร็วภายใน 4 ชั่วโมง ซึ่งหวังว่าต่อไป จะสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์วิธีการ
วิธีรวดเร็ว

นำเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ได้พิสูจน์แล้ว จำนวน 150 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในบิสลัท และกระจายเชื้อในนํ้าเกลือ ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No.2 และนำเชื้อมาหยด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ใน microtiter plate ซึ่งมีนํ้ายาการทดสอบ 12 ชนิด ได้แก่ glucose, OCD, H₂S, Indole,

Malonate, ONPG, Urea, Phenylalanine deaminase, VP, arabinose, sorbitol, motile และ oxidase จากนั้น ปิด microtiter plate ด้วยฟาฟลาสติกกาฟ แล้วเพาะเชื้อไว้ที่ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ ซึ่งอาจเลือกใช้ Common program หรือ Large program Computer Program

Common program เป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่บันทึกข้อมูลของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่พบได้บ่อยๆ ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เพื่อลดจำนวนของฐานข้อมูล ทำให้เพิ่มความรวดเร็วในการปฏิบัติงาน ส่วน Large program เป็นโปรแกรมที่ซับซ้อนที่เก็บข้อมูลของเชื้อ ที่มีโอกาสพบได้จากสิ่งส่งตรวจของมนุษย์

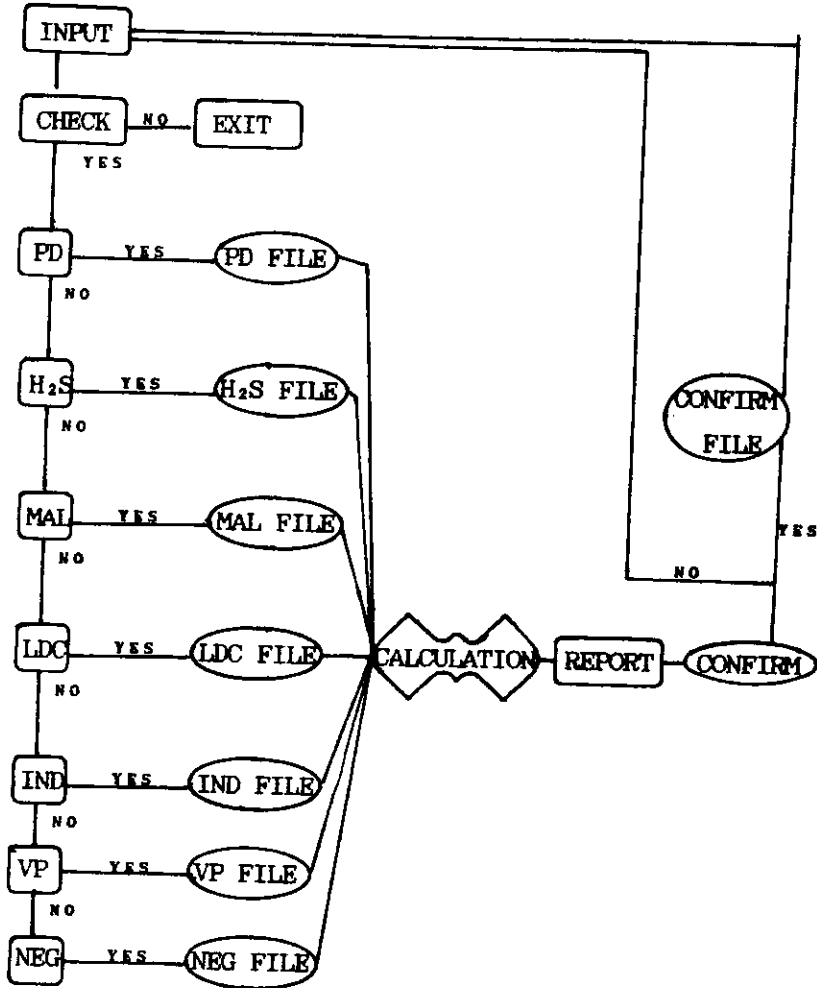
โปรแกรม เขียนโดยใช้โปรแกรมภาษา dBase III plus และมีพนักงานทำงาน ตามแผนภาพที่ 1

ผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบ การทดสอบอย่างรวดเร็ว ระหว่างเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน blood agar และ McConkey agar จำนวน 100 สายพันธุ์ ปรากฏว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน blood agar ให้ผลการทดสอบถูกต้อง 92% ส่วนเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน McConkey agar ให้ผลถูกต้อง 75%

เมื่อทำการพิสูจน์เชื้อโดยวิธีรวดเร็ว ที่สามารถอ่านผลได้ภายใน 4 ชั่วโมง เทียบกับวิธีมาตรฐานที่จำเป็นประจำ พบว่าให้ผลถูกต้อง 134 isolates จาก 150 isolates คิดเป็น 89.33% ส่วนเชื้อที่อ่านผิดไป 16 isolates คิดเป็น 10.67% ได้แก่ Enterobacter cloacae 6 isolates, Enterobacter sakazakii 2 isolates, Escherichia coli 2 isolates, Shigella sonnei 1 isolate, Klebsiella pneumoniae 2

แผนภาพที่ 1 แสดงการทำงานของ computer program



*** COMMON ORGANISM IN ROUTINE ***

GLU	LDC	ODC	H ₂ S	IND	MAL	ONPG	UR	PD	VP	ARA	SOR	MOT
+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-

NAME	PERCENT	SCORE
<i>K.pneumoniae</i>	96.75	0.96748327
<i>K.oxytoca</i>	1.98	0.01975642
<i>E.aerogenes</i>	1.22	0.01222573
<i>Hafnia alvei</i>	0.05	0.00046486
<i>E.coli</i>	0.01	0.00006973

DO YOU WANT TO CONFIRM (Y/N)

Table 1 Incorrect identification by rapid test

Quantity	Organism	Incorrect identification	Incorrect reaction
1	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.ozaenae</i>	VP
1	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.lipuefaciens</i>	- ^a
1	<i>K.rhinoscleromatis</i>	<i>K.ozaenae</i>	Sor
1	<i>K.sonnei</i>	<i>Y.pestis</i>	ONPG
1	<i>P.rustigianii</i>	<i>P.alcalifaciens</i>	- ^b
1	<i>P.rettgeri</i>	<i>P.stuartii</i>	Urea
3	<i>E.cloacea</i>	<i>E.sakazakii</i>	Sor
2	<i>E.cloacae</i>	<i>E.aggolmerens</i>	Sor
1	<i>E.cloacea</i>	<i>H.alvei</i>	LDC and Sor
1	<i>E.cloacea</i>	<i>E.taylorae</i>	Sor
1	<i>E.sakazakii</i>	<i>H.alvei</i>	LDC and Mal
1	<i>E.sakazakii</i>	<i>E.taylorae</i>	Mal
1	<i>E.coli</i>	<i>E.fergusonii</i>	Sor

^a = differentiate by motility, ^b = differentiate by Trehalose and Inositol

isolates, *Klebsiella rhinoscleromatis* 1 isolate, *Providencia rustigianii* 1 isolate และ *Providencia rettgeri* 1 isolate

การแปลผลเปรียบเทียบระหว่าง computer program 2 program ผลปรากฏว่า common program แปลผลถูกต้อง 89.33% และ Large program แปลผลถูกต้อง 84.66% แสดงถึง เชื่อที่พิสูจน์ผิด ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อใน genus *Enterobacter* และ อาหารทดสอบที่อ่านผลผิดพลาดที่สุดคือ sorbitol

วิจารณ์

เมื่อเปรียบเทียบการทดสอบที่เสนอ กับการวินิจฉัยโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปต่างๆ ได้แก่ API 20E, Enteri Tek, Enterotube II, Micro Dilution System และ Minetek ซึ่งให้ผลการพิสูจน์เชื้อใน family นี้ถูกต้องเป็น 92%, 96.3%, 96.5%, 97% และ 93.8% ตามลำดับ^(๕) ซึ่งดูจากจำนวนเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง วิธีที่เสนอนี้อาจให้ค่าที่ต่ำกว่า แต่เชื่อว่า ถ้าได้รับการปรับปรุงต่อไป อาจมีความถูกต้องเพิ่มขึ้นจนเป็นที่น่าพอใจได้

สาเหตุ ที่ทำให้วิธีการพิสูจน์เชื้ออย่างรวดเร็วได้ผลผิดพลาด อาจสรุปได้เป็นข้อๆ ดังนี้

1. การอ่านผลการทดสอบผิด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุเกือบทั้งหมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อมีการใช้สารที่เข้าในการทดสอบได้ช้า ทำให้การอ่านผลภายในเวลาการเพาะเลี้ยง 4 ชั่วโมงไม่ชัดเจน เช่น การทดสอบด้วยน้ำตาล sorbitol ซึ่งมี pH สูงประมาณ 8 ภายในเวลา 4 ชั่วโมง อาจทำให้เชื้อย่อยน้ำตาล แล้วเกิดเป็นกรดได้ไม่มากพอที่จะเปลี่ยน pH ให้ต่ำลงจนทำให้ indicator เปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองได้สมบูรณ์ จะเห็นเป็นเพียงสีเขียวอ่อน ทำให้การอ่านผลผิดพลาด ถ้าหากได้ทำการอ่านเลี้ยงเชื้อต่อไปอีก

มากกว่า 4 ชั่วโมง อาจจะทำให้สีของ indicator เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอย่างสมบูรณ์ ในการทดสอบครั้งนี้ พบความผิดพลาดจำนวน 9 ตัวอย่าง จากการทดสอบ 150 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 6%

น้ำตาล sorbitol สามารถแยก *E.coli* ออกจาก *E.fergusonii*^(๕) ถ้าอ่านผลผิดไป จะอ่านผลเป็นเชื้ออีกชนิดหนึ่ง สาเหตุหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงของ pH เนื่องจากขั้นตอนการ sterile โดยการ autoclave ความร้อนจะทำให้ peptone base ซึ่งเป็นส่วนผสมอยู่ในอาหารชนิดนี้คั่งยว เพิ่มความเป็นด่างแก่สารละลาย ทำให้ pH สูงขึ้น การแก้ไขปัญหานี้ ต้องทำการปรับ pH ของสารละลายให้หลังจากทำการ autoclave แล้ว และสีของอาหารเปลี่ยนมาจากสีเขียวเป็นสีฟ้าด้วย HCl 0.1N

2. โปรแกรม ที่ใช้แปลผล การพิสูจน์เชื้ออาศัยผลการทดสอบเพียง 12 ชนิด ยังไม่เพียงพอ เชื้อบางกลุ่มให้ผลที่คล้ายกันมาก แต่สามารถแยกจากกันได้ด้วยการทดสอบ Motility เช่น *K.pneumoniae* (non motile), *S.lipuefaciens* (motile) ให้เปอร์เซ็นต์ 87% ดังนั้น การทดสอบอย่างรวดเร็วนี้ ควรนำเอาการทดสอบ motility เข้ามาช่วยแปลผลร่วมด้วย

3. เชื้อบางสายพันธุ์ใน genus เดียวกัน การทดสอบ 12 ชนิดของวิธีการทดสอบอย่างรวดเร็วนี้ ไม่สามารถแยกเชื้อบางสายพันธุ์ใน genus เดียวกันออกจากกันได้ เช่น การแยก *P.rustigianii* จาก *P.alcalifaciens* ต้องทำการทดสอบเพิ่ม โดยทดสอบกับน้ำตาล Trehalose, Galactose, Adonitol^(๖) เพื่อแยก species ทั้ง 2 ออกจากกัน

4. Computer program ที่สร้างขึ้น เขียนด้วยภาษา dBase III plus การแปลผล

โดยคอมพิวเตอร์ เชื้อบาง species ให้เปอร์เซ็นต์ความน่าจะเป็นต่ำ หรือแปรปรวนมาก อาจเป็นเพราะฐานข้อมูลที่ยัง เป็นฐานข้อมูลของต่างประเทศซึ่งมี factor ต่างๆ ผิดกับในประเทศไทยของเรา จึงทำให้ฐานข้อมูลผิดกันบ้าง ผลที่ออกมาจึงมีความแปรปรวน นอกจากนั้น ข้อมูลที่ยัง เป็นผลที่ได้จากการอ่านผลหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อไปแล้วเพียง 4 ชั่วโมง

สรุป

การทดสอบโดยวิธี Microbiochemical และแปลผลโดยไมโครคอมพิวเตอร์ สามารถให้ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อ Enterobacteriaceae อย่างรวดเร็วเพียง 4 ชั่วโมง โดยให้ผลถูกต้อง 89.33% และเชื้อที่ให้การตรวจพิสูจน์ผิดไป 16 สายพันธุ์ คิดเป็น 10.67% จากเชื้อทั้งหมด 150 สายพันธุ์ การทดสอบที่ทำให้ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อผิดไปได้มากที่สุดคือ การตรวจด้วยน้ำตาล sorbitol ซึ่งต้องมีการปรับปรุงแก้ไขให้แม่นยำ และเชื้อที่ใช้ในการทดสอบควรทำการเพาะเลี้ยงบน blood agar เนื่องจากมีการรบกวนจากปัจจัยต่างๆ น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงบน McConkey agar

เอกสารอ้างอิง

1. Rapka EW. Truthable classification and identification. Space Life Sci 1971; 3: 135-156.
2. Rapka EW, Clapper WE, Bowen IG and Babb R. A Model for identification of bacteria. J Gen Microbiol 1967; 46: 407-424.

3. Farmer JJ, Ill BR, Davis FW, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1984; 21: 46-76.
4. Nissen B. Microtests for rapid identification of Enterobacteriaceae. Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B. 1984; 92: 239-245.
5. มวลัย วารจักร. ชุดน่ายาสำเร็จรูปที่ใช้ในการวินิจฉัย Bacteria และเชื้อรา. วารสารสมาคมเทคนิคการแพทย์ ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2529 หน้า 13-17.
6. ประสิทธิ์ ธีราวัชรกุล. การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และการติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ. ภาควิชาจุลชีววิทยา และหน่วยปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2529, หน้า 11-18.

มารศรี ไกรวิโรจน์,

วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กลัยเคทฮีมาโกลบินในเม็ดเลือดแดงส่วนต่างๆ

นันทยา ชนะรัตน์, เสกสรร แสนธิเลิศ และ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์

บทคัดย่อ ระดับกลัยเคทฮีมาโกลบินในเม็ดเลือดแดงส่วนบนและส่วนล่าง ที่ได้จากการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำ hemolyzate มาต้มกับการดออกซาลิก และทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid วัดสีที่ 443 นาโนเมตร ได้ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของเม็ดเลือดแดงส่วนบน และส่วนล่างเท่ากับ 10.55 ± 1.37 และ 12.18 ± 2.26 ไมโครโมลต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($t = 4.69$, $p < 0.005$) การตรวจวัดระดับกลัยเคทฮีมาโกลบินในเม็ดเลือดแดงแยกส่วนนี้ มีประโยชน์สำหรับดูภาวะน้ำตาลสูงเรื้อรังย้อนหลังในช่วงเวลาต่างๆ และใช้ทำนายอายุของเม็ดเลือดแดงได้ (คำรหัส: กลัยเคทฮีมาโกลบิน, เม็ดเลือดแดง) วารสารแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ปีที่ 23 ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน 2533 หน้า 155-159

Abstract Glycated Hemoglobin in Fractionated Red Blood Cells.

Chanarat N, Saentilert S and Chanarat P.

Glycated hemoglobin in the upper and lower fractionated erythrocytes was measured after centrifugation of packed red cell at 13,000 rpm for 10 minutes. The hemolysate was boiled with oxalic acid and the furfural formed was then reacted with thiobarbituric acid to form a colored product which was measured at 443 nm. The glycated hemoglobin in the upper red cell fraction was 10.55 ± 1.37 μ mole/L which was highly significant lower ($t = 4.69$, $p < 0.005$) than the lower fraction, 12.18 ± 2.25 μ mole/L. The determination of glycated hemoglobin in the fractionated erythrocyte can be used as an index of glycemic control for diabetic patients. It can also be applied for the estimation of erythrocyte survival.

(Keyword : Glycated hemoglobin, red blood cell) Bull Chiang Mai AMS 1990; 23: 155-159

ภาควิชาพยาธิวิทยา (แพทยศาสตร์บัณฑิต) ของ นายเสกสรร แสนธิเลิศ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กลัยเคชันฮีโมโกลบิน (Glycated hemoglobin, Glycosylated hemoglobin, Glycohemoglobin, gHb หรือ HbA_{1c}) เกิดจากการรวมตัวของ HbA กับกลูโคส 2 โมเลกุล (1) การหาปริมาณ gHb สามารถทำได้โดยวิธี spectrophotometric method, Electrophoresis, Isoelectric focusing chromatography, Affinity chromatography และ High performance liquid chromatography (HPLC)

เนื่องจากปริมาณของ glycated hemoglobin ในเลือดหรือพลาสมา ขึ้นอยู่กับระดับกลูโคสอิสระ, ระยะเวลาที่โปรตีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาล และอายุครึ่งชีวิตของโปรตีนแต่ละชนิด ดังนั้นในเม็ดเลือดแดงที่อายุน้อย ๆ จึงมีปริมาณ gHb น้อย แต่เมื่อเม็ดเลือดแดงมีอายุมากขึ้น โอกาสที่มันจะสัมผัสกับกลูโคสในพลาสมา ก็มากขึ้น ดังนั้นเซลล์ที่มีอายุมาก และหรือ มีความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมาที่สูงมากนั้น โอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยา glycation ก็มากขึ้น ฉะนั้น การตรวจวัดปริมาณ gHb จึงมีประโยชน์ในการบอกถึงระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงระยะเวลาต่างๆ กัน ตามอายุของเม็ดเลือดแดงที่เราใช้

การศึกษาการตรวจระดับ gHb ในแต่ละส่วนของเม็ดเลือดแดง เพื่อเป็นประโยชน์ ในการตรวจควบคุมระดับน้ำตาลในช่วงเวลาสั้นและในช่วงเวลายาว จากการเจาะเลือดเพียงครั้งเดียว และเพื่อเป็นประโยชน์ในการทำนายอายุของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย หรือผู้ป่วยโรคเลือดอื่น ๆ และเพื่อแพทย์ นำไปใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการรักษาผู้ป่วยเบาหวาน ว่าผู้ป่วยสามารถดูแลตนเอง ได้ดีเพียงใด ขณะที่อยู่บ้าน รายงานนี้จึงได้ทำการศึกษาระดับ gHb ในแต่ละส่วนของเม็ดเลือดแดง เพื่อนำไปใช้เป็นประโยชน์ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ ได้จากการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำของคนทั่วไป เดิมสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ปริมาณ 1 มก./มล. นำมาเก็บไว้จนรูป hemolysate แบ่งเป็นส่วนเล็กๆ ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10x75 มม. จนเต็มแช่แข็ง เพื่อใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพของการทดลอง

2. ตัวอย่างการทดสอบ ได้จากการเจาะเลือดคนปกติ จำนวน 25 ราย เป็นชาย 15 คน หญิง 10 คน อายุตั้งแต่ 20-23 ปี โดยเติม EDTA เช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุมคุณภาพ นั้นแยกพลาสมา และนำเม็ดเลือดแดงมาแยกส่วนโดยเร็ว โดยนำ packed red cell มาปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บแบ่งเป็นครึ่งบนและครึ่งล่าง เพื่อหาปริมาณ gHb

3. การหาปริมาณฮีโมโกลบิน โดยใช้วิธีของ van Kampen และ Zijlstra ใช้ยา VKZ ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ (2)

K ₂ Fe(CN) ₆	0.2	กรัม
KCN	0.05	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.14	กรัม
Sterox SE	0.5	มล.
เติมน้ำให้ครบ	1,000	มล.

4. การหาปริมาณ gHb

ใช้วิธีการทำให้เกิดสี โดยมีหลักการดังนี้คือ gHb จะเปลี่ยนเป็น 5'-Hydroxymethylfurfaldehyde (HMF) เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดออกซาลิกที่อุณหภูมิสูง นำสารที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ TBA วัดสีที่เกิดขึ้นที่ 443 นาโนเมตร (3)

วิธีทำ นำ hemolysate ที่ปรับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินให้เป็น 5 กรัม/ดล. แล้วจำนวน 1 มล. เติม 0.3 โมลต่อลิตรของ กรดออกซาลิกลงไป 1 มล. ต้มบนน้ำเดือด นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็น แล้วเติม 40% trichloro-

acetic acid ลงไป 1 มล. เขย่าแรงๆ แล้ว
ปั่นแยกเอาส่วนน้ำมา 2 มล. เติม 0.05 มล
ตัวลดของ TBA ลงไป 0.5 มล. อุณหภูมิ 37 °ซ
นาน 1 ชั่วโมง ทำห้เย็นแล้ววัดค่าการดูดกลืน
แสงที่ 443 นาโนเมตร หาความเข้มข้นโดย
เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการใช้ 5'-HMF
ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทำปฏิกิริยาแบบเดียวกัน

ผลการทดลอง

วิธีการหาปริมาณ gHb ที่ใช้ มีความเที่ยง
(precision) เมื่อทำ hemolysate ตัวอย่าง
เดียวกันพร้อมๆ กัน จำนวน 10 หลอด เท่ากับ
2.87 %CV (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน
= 14.62 ± 0.42) และเมื่อทำต่างวันกัน =
3.9 %CV (14.61 ± 0.58)

ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธี
เมื่อใช้ 5'-HMF ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 0
ถึง 50 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าวิธีที่ใช้มีค่า
ความเป็นเส้นตรงโดยตลอด

ความถูกต้องของวิธีการ โดยการศึกษาค่า
การวิเคราะห์หักกลับคืน (% recovery) ของ 5'-
HMF ที่เติมลงใน pooled hemolysate ที่มี
ค่าความเข้มข้น 16 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่ามี
ค่าตั้งแต่ 80.00% ถึง 100.41% ดังตารางที่ 1

ระดับของ gHb ในเม็ดเลือดแดงส่วนต่างๆ
ของคนปกติ มีค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความเบี่ยงเบน
มาตรฐาน ของระดับ gHb ในเม็ดเลือดแดง
ส่วนบนและส่วนล่าง เท่ากับ 10.55 ± 1.37 และ
 12.18 ± 2.26 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่ง
เมื่อทดสอบโดยการทำ paired t test พบว่า
มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 1
วิจารณ์

จากกราฟมาตรฐานที่ใช้ 5'-HMF ความ
เข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 50 ไมโครโมลต่อ
ลิตร ซึ่งเป็นเส้นตรงโดยตลอด แสดงว่ารูปกราฟ
นี้ สามารถอ่านค่าของ 5'-HMF ได้ครอบคลุมค่า

ตารางที่ 1 ค่าการวิเคราะห์หักกลับคืนของ 5'-
HMF ที่เติมลงใน hemolysate (16
ไมโครโมลต่อลิตร)

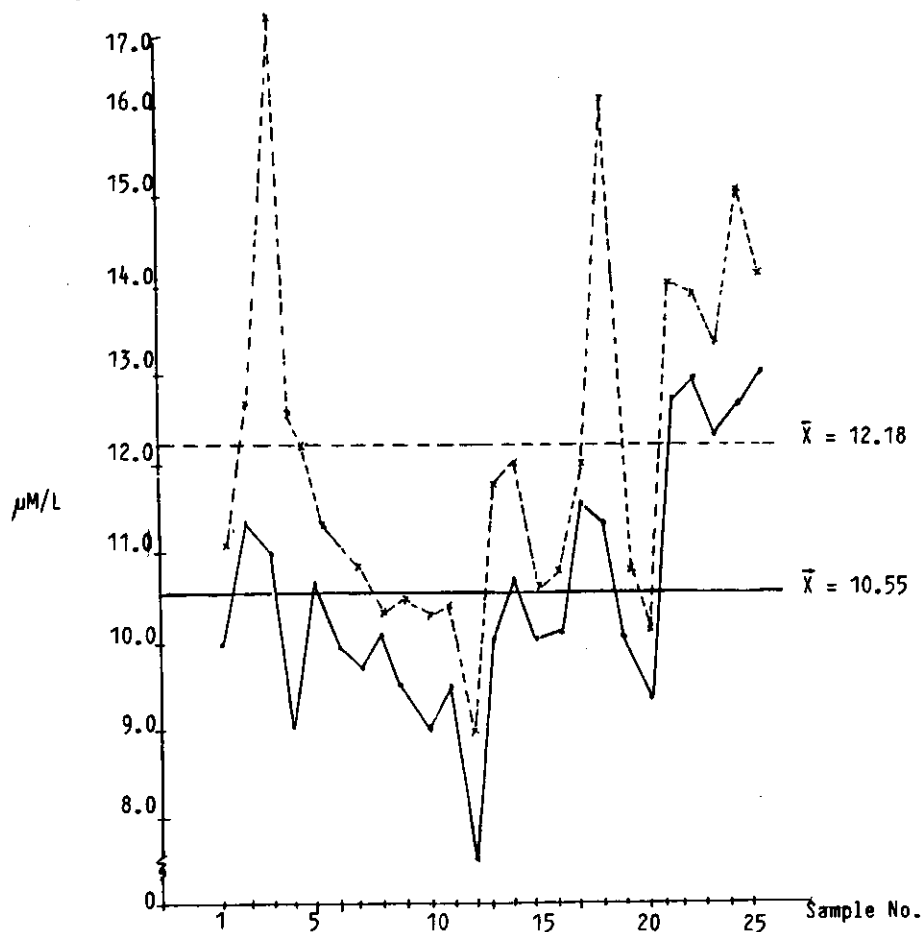
HMF added $\mu\text{mole/L}$	%Recovery
0.75	114.70
1.25	106.40
2.50	80.00
3.75	96.80
6.30	105.80
9.40	95.75
12.50	106.40
18.80	97.50
average	100.41

ทั้งหมด ซึ่งนับว่าเพียงพอสำหรับการตรวจวัดปริ
มาณ gHb โดยทั่วๆ ไป ทั้งในคนปกติ และผู้ป่วย
เบาหวาน

ค่าความถูกต้อง เมื่อตรวจค่าการวิเคราะห์
กลับคืนนั้น พบว่า วิธีการนี้ สามารถชี้บอกความ
แตกต่างของระดับ 5'-HMF ได้อย่างน้อย 0.75
ไมโครโมลต่อลิตร ซึ่งนับว่าเพียงพอที่จะชี้บอก
ความแตกต่างในการศึกษานี้ได้

ในการหาปริมาณ gHb ในเม็ดเลือดแดง
ส่วนบนและส่วนล่าง จำนวน 25 ราย แม้ว่าจํานวน
ตัวอย่างจะน้อยมากนัก แต่ก็พบว่าสามารถแยก
ความแตกต่างระหว่างค่าในส่วนบน และส่วนล่าง
ได้ชัดเจน

จากการศึกษาของ Nakashima และคณะ
ซึ่งได้แยกเม็ดเลือดแดงออกเป็นส่วนๆ (๖) และ
หาปริมาณ gHb โดยวิธี High performance



รูปที่ 1 ระดับ gHb ในเม็ดเลือดแดงส่วนบน (—) และส่วนล่าง (-----) ของคนปกติ

liquid chromatography พบว่าระดับ gHb ในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน สามารถบอกได้ถึงภาวะการตอบสนองต่ออินซูลิน (insulin response) หรือ ระดับน้ำตาลในเลือดย้อนหลัง ในระยะสั้น ระดับ gHb ในส่วนกลางๆ จะสอดคล้องกันกับปริมาณของ fructosamine หรือชี้บอกภาวะน้ำตาลในเลือดย้อนหลังระยะปานกลาง ส่วน gHb ในเม็ดเลือดแดงตัวแก่ หรือส่วนล่าง จะ

บอกภาวะน้ำตาลย้อนหลังเป็นระยะยาวๆ ได้

การศึกษาครั้งนี้ ยังไม่สามารถทำการแยกส่วนเม็ดเลือดแดงให้ละเอียดมากกว่านี้ เนื่องจากจะต้องใช้เลือดเป็นจำนวนมาก รวมทั้งเงินการปั่นแยกชั้นของเม็ดเลือดแดง ใช้หลอดขนาดเล็กและสั้น ซึ่งยากต่อการแบ่งชั้นและดูดแยกเม็ดเลือดแดง จึงได้ทำการแบ่งออกเป็นเพียงสองส่วน คือครึ่งบนและครึ่งล่าง ซึ่งจากการทดลอง

ก็พบว่าสามารถพบความแตกต่างของระดับ gHb ในส่วนทั้งสองอย่างชัดเจน

การศึกษาระดับ gHb ในเม็ดเลือดแดงแต่ละส่วนให้ละเอียดขึ้นขั้นต่อไป ควรเลือกวิธีวิธีการหาปริมาณ gHb ที่มีความไวสูงและใช้ปริมาณเลือดน้อยๆ รวมทั้งใช้เวลาในการทดสอบช่วงสั้น เช่น วิธี Affinity column chromatography, HPLC และหาวิธีการเพื่อนำแยกเม็ดเลือดแดงให้ละเอียดขึ้น และเหมาะสมมากกว่านี้ และควรจะทำการศึกษาต่อไปโดยเปรียบเทียบระดับ gHb ในเม็ดเลือดแดงแต่ละส่วนเทียบกับระดับน้ำตาลในเลือด, fructosamine ในพลาสมา เพื่อความสัมพันธ์กับภาวะน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

นอกจากนั้น การศึกษาครั้งนี้ อาจนำไปประยุกต์ เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาผู้ป่วยโรคเลือดต่างๆ เพื่อคาดคะเนอายุของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยโรคเลือดต่างๆ เช่น ธาลัสซีเมีย, ภาวะโลหิตจางชนิดอื่นในวัยเด็ก ซึ่งมีความผิดปกติเกี่ยวกับเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นและสลายตัวได้เร็ว ดังนั้น ระดับ gHb ของเม็ดเลือดแดงแยกส่วนจะมีค่าต่ำกว่าในคนปกติทั่วไป และอาจใช้บอกได้ถึงความรุนแรงของโรคจากการประมาณค่าอายุของเม็ดเลือดแดง หรือระดับ gHb นี้ได้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Bernstein RE. Nonenzymatically glycosylated protein. In Advanced in Clinical Chemistry. Vol 26, Spiegel HE (ed), Academic Press Inc, 1987, p 1-78.
2. Davidsohn I and Henry JB. Todd-Sandford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. WB Saunders, 14th ed, 1969, p 32-50, 126-176.
3. Chanarat N, Chanarat P and Keoplung M. Glycated Hemoglobin : A suitable method. Bull Chiang Mai AMS 1988; 21: 31-38.
4. Nakashima K, Nishizaki O, Andoh Y, et al. Glycated hemoglobin in fractionated erythrocytes. Clin Chem 1989; 35: 958-962.

นันทยา ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ข่าว
การประชุมนานาชาติ

- (1) **The 5th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry**
 Kobe, Japan
 September 29 - October 4, 1991

- (2) **4th Asean Conference in Medical Laboratory Technology**
 Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand
 April 1 - 5. 1991

- (3) **The 7th International Symposium on Quality Control, Tokyo**
 June 15-16, 1991
 Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan

- (4) **2nd Asia-Pacific Congress of Virology**
 17-22 November 1991
 Ambassador Hotel, Bangkok

- (5) **XV International Congress of Clinical Chemistry**
 31st Annual Conference, Australian Association of Clinical
 Biochemists, Inc.
 6th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry
 Melbourne, Australia
 November 14 - 19, 1993

รายงานพิเศษ

เทคนิคการวิจัยขั้นสูงทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา :
CATALYTIC MONOCLONAL ANTIBODY

ณ The Weizmann Institute of Sciences ประเทศอิสราเอล

สิชล สงค์ศิริระ

=====

ในการทำแอนติบอดีจาก ascites มีความบริสุทธิ์ พบว่าวิธี Protein A Affinity chromatography มีประสิทธิภาพดีกว่างานด้านปริมาณ คือสามารถ load sample ได้ครั้งละ 3 มล. เมื่อเทียบกับวิธี HPLC ซึ่ง load ได้ครั้งละ 0.25 มล. เมื่อนำเอาแอนติบอดีที่แยกได้โดยวิธีทั้งสอง มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าวิธี Protein A Affinity chromatography ให้ความบริสุทธิ์ดีกว่า คือ ๑.๓ เพียง 3 lines เท่านั้น ในขณะที่วิธี HPLC ๑.๓ 5 lines ด้วยกัน จากการทดสอบการจับกับแอนติเจน และ catalytic assay พบว่าไม่แตกต่างกัน

Catalytic monoclonal antibody (CMA) เป็นแอนติบอดีที่ทำมาจากร่างกายของหนู โดยอาศัยส่วน Fab ซึ่งมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เหมาะสม ที่สามารถย่อย (Catalyze) สับสเตรตได้ ในการสร้าง CMA ต่อ hapten หรืออีกันยหนึ่ง คือสับสเตรตที่ต้องการให้แอนติบอดีทำปฏิกิริยา catalyze โดยอาจจะต้องมีการดัดแปลงตัว hapten เองให้มีความเหมาะสมที่จะกระตุ้นให้เกิด CMA จากนั้นจึงรวมตัวกับตัวพา (carrier) มักนิยมใช้ Bovine serum albumin หรือ keyhole limpet hemocyanin ประกอบกับการใช้เทคนิค Hybridoma และการเลือก clone ที่เหมาะสม โดยวิธี Short analog competitive ELISA ทำให้เกิด ascites หลังจากที่ได้ ascites จำนวนมากแล้ว ขั้นตอนต่อไปที่สำคัญ

คือ การแยกแอนติบอดีออกจากโปรตีนหรือสารอื่นๆ ใน ascites ที่อาจจะให้ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ CMA ได้ ซึ่งขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก เพราะมีเช่นนั้น ปฏิกิริยา catalyze ที่เกิดจะไม่ได้มาจากแอนติบอดี ในการฝึกอบรมครั้งนี้ ผู้รายงานได้รับการฝึกอบรม โดยปฏิบัติด้วยตนเอง ในการแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยวิธี High

* รายงานการฝึกอบรม ณ ต่างประเทศโดยทุน AID/CDF Project C5-187 (No. 936-5544-G-00-6034-00) ระหว่างวันที่ 10 ตุลาคม ถึงวันที่ 1 ธันวาคม 2533

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่

performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ column DESE-TKS-5PW เปรียบเทียบกับวิธี Protein A Affinity chromatography และทำการทดสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้ ทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับสับสเตรทและสามารถ catalyze สับสเตรทได้หรือไม่ โดยการฟิสิกส์และการปฏิบัติทั้งหมด อยู่ภายใต้การดูแล และการให้คำแนะนำจาก Prof. Bernard S. Green และ Prof. Zelig Eshhar การแยกแอนติบอดีจากน้ำในช่องท้อง (ascites) โดยใช้ HPLC

นำ ascites มาปั่นที่ 10,000 g นาน 5 นาที เจือจางเป็น 1:4 ด้วย 20 mM Tris buffer pH 8.5 กรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมครอน ฉีดเข้าสู่ column (DEAE-TKS-5PW, 70 mm x 750 mm) ทำการ elution ดังนี้

Solution A (20 mM Tris buffer pH 8.5) 90% + Solution B (3 M sodium citrate ใน 20 mM Tris buffer pH 8.5) 10% ลงอัตราส่วนนี้ไว้นาน 2.5 นาที จึงค่อยๆ ลด solution A ลงเหลือ 70% และเพิ่ม Solution B ขึ้นเป็น 30% โดยใช้เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วน (gradient) นาน 17.5 นาที ลงอัตราส่วนนี้ไว้นาน 10 นาที การทำ gradient นี้ทำโดยเครื่อง LDC Analytical-Multiple Solvent Delivery System BIO.COM 4000 ทำการตรวจหาสารที่ผ่านออกมา โดยตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยเครื่อง LDC Analytical Programmable Wave-

length Detector SM 4000 ทำการเก็บ fraction ทั้งหมด 50 หลอด ละ 20 นาที อัตราการไหลของ eluent เท่ากับ 1 มล.ต่อ นาที จะได้ peak ของแอนติบอดีเป็น peak ที่ 2 จาก peak ใหญ่ๆ ทั้งหมด 3 peak การแยกแอนติบอดีจากน้ำในช่องท้อง (ascites) โดยใช้ Protein A Affinity chromatography

นำ 3 มล. ของ ascites ปั่นที่ 10,000 g นาน 5 นาที กรองผ่านแผ่นกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้น ผ่านลงใน Protein A column (bed volume 5 ml. equilibrate ด้วย 30 mM Tris buffer pH 7.5) ทำการล้างสารที่ไม่จับกับ Protein A ออกด้วยบัฟเฟอร์ต่ำเดิมอย่างน้อย 10 เท่าของ bed volume ทำการ elute เอาแอนติบอดีออกโดย 0.2 M glycine buffer pH 2.8 เก็บ fraction หลอดละ 2.5 มล. ทำการ eluate ที่ได้เป็นกลางด้วย 2M Tris buffer pH 8.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ได้

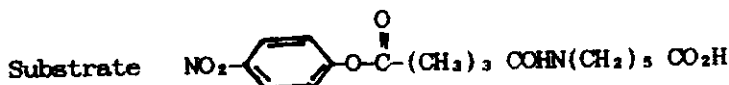
นำแอนติบอดีที่แยกได้มาทำ SDS-PAGE

การทดสอบคุณสมบัติในการจับกับ hapten

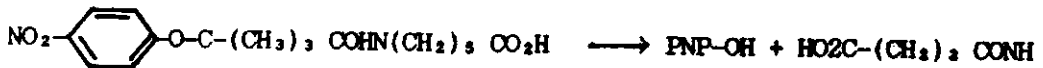
นำเอาแอนติบอดีที่แยกได้มาทำ ELISA โดยใช้ hapten ที่ conjugate กับ BSA

การทดสอบ Catalytic activity

นำเอาแอนติบอดีที่แยกได้ มาปรับให้ได้ความเข้มข้น 1.8 มก./มล. และนำมา 70 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท 20 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตรของ 30 mM Tris buffer pH 8.0 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดยวัดแบบ kinetic คือวัดทุกๆ นาที ตลอดเวลา 15 นาที



ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังนี้



ข้อเสนอแนะ

แนวความคิดเรื่อง Catalytic antibody มีมานานแล้ว แต่ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากยังไม่มี hybridoma technology แต่จนปัจจุบัน แนวคิดนี้ กำลังได้รับความสนใจกัน ทั่วศึกษากันอย่างจริงจัง และประสบความสำเร็จมากขึ้นตามลำดับ อนาคตของ CMA ยังเป็นที่ น่าสนใจต่อบุคลากรทางการแพทย์ และทางอุตสาหกรรม ซึ่งต้องอาศัยการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยา โดยพีเอ็นเอ็ม อาทิ เช่น การผลิตยาบางชนิด หรือสารบางชนิดที่เตรียมขึ้น โดยอาศัยเอ็นเอ็มที่ เตรียมได้ยากหรือมีราคาแพง ตลอดจนปฏิกิริยาที่ ยากที่จะเกิดขึ้นก็อาจจะใช้ CMA เป็นตัวเหนี่ยวนำ

นำทำให้เกิดปฏิกิริยานั้นๆ ได้ ซึ่งความรู้ที่ได้จากการฝึกอบรมในครั้งนี้ เป็นประโยชน์โดยตรงต่อการเรียนการสอนนิสิตนักศึกษามัธยมศึกษาชั้นสูง จนระดับปริญญาตรีและปริญญาโท ตลอดจนการวิจัยที่ อาจเกี่ยวข้องกับ catalytic monoclonal antibody เป็นอย่างมาก

ศิษย์ สงค์ศิริ วท.ม. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก
คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ข่าวประชุมวิชาการ

ASIAN PACIFIC CONGRESS ON BLEEDING DISORDERS AND TRANSFUSION MEDICINE

May 12 - 16, 1992, กรุงเทพฯ

ค่าลงทะเบียน	ก่อน 15 Oct, 1991	380 US\$
	หลัง 15 Oct, 1991	430 US\$

ติดต่อได้ที่

Dr.Thip Sripaisai
Division of Pediatrics
Hematology
ร.พ.พระมงกุฎฯ
กรุงเทพ 10400

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN

of Institute for Immunology University of Vienna, Austria*

วัชร กสิณุกษ์**

=====

รายงานนี้เป็นรายงานการฝึกอบรม ณ Institute for Immunology University of Vienna ณ ประเทศออสเตรีย ซึ่งได้เรียนรู้เทคนิคที่ทันสมัยต่างๆ มากมาย เช่น เทคนิคทาง molecular biology อันได้แก่ Transformation technique, Plasmid miniprep, และ Agarose electrophoresis เพื่อแยกและตรวจหาขนาดของ DNA นอกจากนี้ยังได้เรียนรู้เทคนิค DEAE-Dextran transfection ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำเอา DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนของคนที่เข้าไปใน eukaryotic cell ชนิดอื่น เพื่อให้ eukaryotic cell นั้นๆ สร้างโปรตีนที่ถูกกำหนดโดย DNA ที่ใส่เข้าไปนั้นให้ปรากฏในตัวเซลล์ และยังได้เรียนรู้เทคนิคที่เรียกว่า Immunoprecipitation ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำเอา monoclonal antibodies มาตรวจหาโครงสร้างและนำพามาแยกของ โปรตีนอีกด้วย

1. เทคนิคที่ได้รับการฝึกอบรมคือ

1. Introduction of Plasmid DNA into E.coli และการเตรียม Plasmid DNA จาก E.coli

2. DEAE-Dextran Transfection

3. Immunoprecipitation

ในการฝึกอบรมครั้งนี้ อยู่ในความดูแลของ Prof. Dr. Walter Knapp และ Dr. Hannes Stockinger ซึ่งมีรายละเอียดด้านการฝึกอบรม ดังนี้

* รายงานการฝึกอบรม ณ Institute for Immunology University of Vienna ประเทศออสเตรียระหว่างวันที่ 26 กันยายน 2531 - 31 พฤษภาคม 2532

** อาจารย์ประจำภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1. Introduction of Plasmid DNA into E.coli และการเตรียม Plasmid DNA จาก E.coli

หลักการ

เพื่อเพิ่มจำนวน Plasmid DNA ที่กำหนดไว้บนที่ที่ต้องการจึงต้องใส่ Plasmid DNA ดังกล่าวเข้าไปใน E.coli เมื่อ E.coli แบ่งตัวจะทำให้ Plasmid DNA เพิ่มจำนวนตามไปด้วย การใส่ Plasmid DNA เข้าไปใน E.coli นี้ เรียกว่า Transformation technique หลังจากที่ได้ E.coli ที่มี Plasmid DNA ที่ต้องการจำนวนมากพอ จึงต้องแยก Plasmid DNA ที่ต้องการออกจาก E.coli เพื่อนำไปศึกษาต่อไป เทคนิคที่ใช้แยก Plasmid DNA ออกจาก E.coli เรียกว่า Plasmid minipreps technique

วิธีทำ

Transformation Technique

- (1) เติมน้ำ E.coli ลงในหลอดพลาสติก ซึ่ง pre-cool อยู่ใน ice bath
- (2) เติมน้ำ plasmid-DNA ลงไป 1 ไมโครลิตร
- (3) ผสมน้ำเข้ากันและ Incubate ใน ice bath 40 นาที
- (4) นำหลอดทดลองไปใส่ใน water bath 42° ซ นาน 45 วินาที
- (5) เมื่อครบเวลานำไปแช่ใน ice bath 2 นาที
- (6) เติมน้ำ SOC solution ลงไป 0.9 มล.
- (7) อุ่นหลอดทดลองที่ 37° ซ นาน 1 ชั่วโมง โดยเขย่าหลอดทดลองไปด้วย ที่ 225 rpm.
- (8) เมื่อครบเวลานำ E.coli ลงหลอดไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB medium) ที่มี Ampicillin และ Tetracyclin

อยู่ด้วย

- (9) อุ่นเชื้อที่ 37° ซ ตลอดคืน เชื้อ E.coli ที่นำเอา plasmid-DNA เข้าสู่เซลล์จะเจริญเป็นโคโลนีให้เห็นได้ด้วยตาเปล่า

2. DEAE-Dextran Transfection

หลักการ

วิธี Transfection เป็นเทคนิคที่ใช้ในการใส่ Plasmid-DNA ของคนเข้าไปใน eukaryotic cell อีกชนิดหนึ่งเพื่อให้ eukaryotic cell ดังกล่าวได้แสดงส่วนของโปรตีนที่ถูกกำหนดโดย plasmid-DNA ที่ใส่เข้าไปนั้นออกมาบนผิวเซลล์

วิธีการ

- (1) เตรียม Transfection solution ดังนี้
 - เติมน้ำ DEAE-Dextran 100 ไมโครลิตร
 - เติมน้ำ chloroquine phosphate 20 ไมโครลิตร
 - เติมน้ำ plasmid-DNA 50 ไมโครลิตร
 - เติมน้ำ DMEN ที่มี 10% Nu Serum 2 มล.
 - ผสมอย่างดี
- (2) เติมน้ำ Transfection solution ทั้งหลอดลงใน eukaryotic cell (ในการฝึกอบรมนี้ใช้ COS 7 เซลล์)
- (3) อุ่นที่ 37° ซ 5% CO₂ นาน 4 ชั่วโมง
- (4) เมื่อครบเวลาถอด medium ออกจากเซลล์ แล้วเติมน้ำ 10% DMSO in PBS ลงไป 3 มล. อุ่นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที
- (5) ล้างเซลล์ 2 ครั้ง แล้วเติมน้ำ DMEN with 10% Nu Serum ลงไป 4 มล.
- (6) นำเซลล์ไปอุ่นที่ 37° ซ 5% CO₂ นาน 48-72 ชั่วโมง
- (7) พิสูจน์การสร้างโปรตีนโดยวิธี Indirect Immunofluorescent technique

3. Immunoprecipitation Technique หลักการ

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาตัดฉลากด้วย I^{125} จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกและนำ cell lysate ที่ได้ไปผ่านบน protein-A sepharose ที่มี monoclonal antibody ติดอยู่ แอนติเจนบนเลือดขาวที่จำเพาะต่อ monoclonal antibody จะถูกจับไว้บน protein-A sepharose เมื่อ elute เอาแอนติเจนนั้นออกจาก protein-A

Plasmid minipreps

1. เลียงเชื้อ E. coli ที่ได้จากการทำงาน Transformation 1 colony ลงใน LB broth ที่มี Ampicillin และ Tetracycline
2. Incubate ที่ 37° ซั ดั้งเดิม โดยเขย่าไปด้วยที่ 275 rpm.
3. ตู E. coli suspension ลงใน Eppendorf tube 1.4 มล. แล้วปั่นที่ 1000 g 1 นาที ตัดน้ำส่วนบนทิ้ง
4. ย่อย E. coli ด้วย Glucomix ที่มี Lysozyme 100 ไมโครลิตร
5. เติม 200 ไมโครลิตร ของ 0.2 N NaOH-1% SDS, incubate ใน ice bath 5 นาที
6. เติม 150 ไมโครลิตร ของ 5M/3M KOAc, mix อย่างดี
7. Incubate ใน ice bath 5 นาที
8. นำหลอดทั้งหมดไปปั่นเก็บน้ำส่วนบน แล้วเติม Phenol $CHCl_3$ ลงไป 400 ไมโครลิตร
9. นำไปปั่น 5 นาที ตูดเก็บชั้น DNA (ชั้นบนสุด)
10. เติม Diethylether ลงไป 300 ไมโครลิตร

11. นำไปปั่น 5 นาที แล้วตูดชั้น Ether ทิ้ง
12. เติม 600 ไมโครลิตร ของ 95% Ethanol ลงไปแล้วนำไปปั่น 1000 g 10 นาที
13. เติม 70% Ethal ลงไป 1 มล. แล้วนำไปปั่น 5 นาที
14. ตูดน้ำส่วนบนทิ้งจนหมด แล้วนำไปอบที่ 37° ซั จนได้ตะกอนแห้ง
15. เติม RNase- H_2O ลงไป 100 ไมโครลิตร /หลอด
16. Plasmid-DNA ที่ได้ นำไปพิสูจน์โดยวิธี Agarose electrophoresis และเก็บที่ -20° ซั

Sepharese ก็สามารถศึกษาและตรวจหาโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนนั้นได้ด้วยวิธี SDS-PAGE

วิธีทำ

- (1) ตัดฉลากแอนติเจนบนเม็ดเลือดขาว ด้วย I^{125}
- (2) ปั่นล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย 1% BSA-PBS ที่มี 10 mM KI
- (3) เติม lysing buffer เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแตก
- (4) ปั่นเก็บ lysate แล้วเติม lysate ลงในหลอดที่มี protein A-sepharose ที่ติดไว้ด้วย monoclonal antibody
- (5) Incubate หลอดทดลองที่ 4° ซั นาน 2-4 ชั่วโมง
- (6) ปั่นล้าง protein-A sepharose 8 ครั้ง
- (7) Elute แอนติเจนด้วย sample buffer แล้วนำ supernatant ไปทำ SDS-PAGE
- (8) นำ SDS-PAGE gel ที่ได้ไปทำ Autoradiograph

- (9) เปรียบเทียบ band ที่ได้กับ standard marker ก็จะทราบถึงน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนที่ต้องการศึกษา

นอกจาก การได้เรียนรู้ เทคนิคต่างๆ ดังกล่าว ยังได้เรียนรู้แบบแผนของการทำวิจัยของคณะผู้วิจัยของสถาบันที่ไปฝึกอบรม แบบแผนการทำวิจัยดังกล่าวเช่นการจัดทำหัตถ์ Journal club ทุกๆ เดือนๆ ละ 2 ครั้ง การจัด Journal club นี้ทำให้คณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์อภิปรายข้อคิดเห็น ตลอดจนได้รับแนวคิดต่างๆ จากผลงานวิจัยของกลุ่มวิจัยกลุ่มอื่น การแบ่งงานวิจัยออกเป็นส่วนย่อย แล้วให้แต่ละคนรับผิดชอบในส่วนย่อย พร้อมทั้งนำผลงานวิจัยมาวิเคราะห์ร่วมกันทุกเดือนๆ ละ 2 ครั้ง ตลอดจนถึงการได้

เห็นการทำงานกันอย่างจริงจัง ของบุคลากรในสถาบันที่ไปฝึกอบรม ทำให้คิดว่าระบบการทำวิจัยที่ได้พบเห็นมานี้ น่าจะนำมาใช้ในประเทศไทย เพื่อยกระดับงานวิจัยให้ดียิ่งขึ้นกว่าเดิม

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Walter Knapp และ Dr. Hannes Stockinger และโครงการความร่วมมือทางวิชาการระหว่างไทย-ออสเตรเลียที่สนับสนุนงานการฝึกอบรมในครั้งนี้

วัชร กสิณฤกษ์, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
วท.ม. (จุลชีววิทยา)

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปกิณกะ

 β -Hydroxybutyrate : ความสำคัญทางคลินิก

นันทยา ชนะรัตน์*

บทคัดย่อ β -Hydroxybutyrate (BOH) เป็นสารคีโตนตัวหนึ่งที่พบว่ามีระดับสูงในภาวะคีโตซิส (ketosis) แต่การตรวจวัดระดับ BOH ยังทำกันไม่แพร่หลายในงานประจำวัน รายงานนี้ ได้เสนอวิธีการตรวจวัดระดับ BOH โดยอาศัยหลักการของเอนไซม์ β -hydroxybutyrate dehydrogenase เปลี่ยน BOH ให้เป็น acetoacetate และ NAD ถูกเปลี่ยนเป็น NADH ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของ NADH ได้ที่ 340 นาโนเมตร คนปกติจะมีระดับ BOH 0.05-0.27 มิลลิโมลต่อลิตร แต่ในผู้ป่วยภาวะคีโตซิส ระดับจะเกินกว่า 5 มิลลิโมลต่อลิตร (คำรหัส: β -hydroxybutyrate, ketosis) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 1990; 23: 169-174

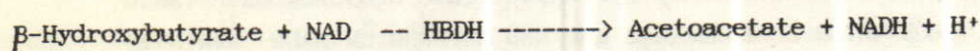
Ketosis เป็นภาวะที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมของ คาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะมักเกิดในผู้ป่วยเบาหวาน และมีภาวะกรดร่วมด้วย เรียกว่า Diabetic ketoacidosis หรือเกิดจากภาวะอดอาหาร (Starvation) ต้มสุราจัด (Acute alcohol abuse) จึงเกิดการออกซิโดซ์แบบไม่สมบูรณ์ของกรดไขมันได้ผลสุดท้ายเป็นสารคีโตน ในคนปกติทั่วไป β -hydroxybutyric acid (BOH) จะเป็นสารคีโตนที่มีปริมาณมากที่สุด คือประมาณ 75% (1-4) และในระหว่างที่เกิดภาวะคีโตซิส BOH ก็จะมีเพิ่มขึ้นจนอัตราที่มากกว่าสารคีโตนอีก 2 ตัวคือ Acetoacetate (AcAc) และ อะซิโตน (acetone) ทั้งนี้ ส่วน

หนึ่งเนื่องจาก AcAc เป็นสารที่ไม่คงตัว และเกิด nonenzymatic decarboxylation กลายเป็นอะซิโตนซึ่งเป็นสารระเหยง่าย การวินิจฉัยหรือติดตามผลการรักษาภาวะ ketosis จึงควรจะเป็น การวัดปริมาณสารคีโตนทั้งหมดในซีรัม แต่จากวิธีที่ใช้ทดสอบกันในปัจจุบัน นับตั้งแต่การใช้ Ketostix ซึ่งเป็นแถบน้ำยา หรือ Acetest ซึ่งเป็นเม็ดน้ำยา จะใช้หลักการของ Rothera คือใช้ nitroprusside ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ AcAc และอะซิโตน และเป็นการวัด

*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เพียงกิ่งปริมาณ โดยไม่สามารถวัด BOH ได้ ดังนั้น จึงมีโอกาที่จะพบการตรวจสารคีโตนด้วยวิธีใช้ nitroprusside ให้ผลลบ หรือได้ค่าที่ต่ำกว่าความเป็นจริงในผู้ป่วย ketosis. หรือเบาหวานที่ควบคุมโรคไม่ได้ (5) มีหลายรายงานที่สนับสนุนว่า BOH เป็นดัชนีที่ดีกว่า AcAc และอะซิโตนในการควบคุมรักษาภาวะ diabetic ketoacidosis (4, 6-8) หรือแม้แต่การตรวจภาวะ subclinical ketosis (5) นอกจากนี้ AcAc และอะซิโตน ยังเป็นสารที่ไม่คงตัวเท่า BOH จากเหตุผลต่างๆ ดังกล่าว จึงได้มี



การพัฒนาวิธีการอื่นๆ มีวัตถุประสงค์เพื่อลดปริมาณสารตัวอย่าง ทำให้ราคาการทดสอบต่ำลง หรือใช้เวลาน้ำในการทดสอบน้อยลง เป็นต้น วิธีการต่างๆ ส่วนใหญ่จึงมีหลักการเหมือนกัน แต่ต่างกันที่สภาวะที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ความคงตัวของน้ำยา และค่าปกติที่ตรวจวัดได้ในประจำ กร เป็นต้น (3, 4, 9-11) วิธีการต่างๆ ดังกล่าวสามารถนำไปใช้ เป็นการทดสอบแบบฉุกเฉินได้

ค่าปกติที่มรายน คือ 0.02-0.27 มิลลิ
โมลต่อลิตร หรือ 0.2-2.81 มก./ดล. (4)
และในผู้ป่วย ketoacidosis มีค่าเกิน 5 มิลลิ
โมลต่อลิตร หรือ 50 มก./ดล. (12-13)

ตัวอย่างวิธีทดสอบ

1. วิจัยของ Custer และคณะ (14) ใช้เครื่อง Centrifichem 400 Pipettor and Analyzer (Baker Instrument Co.)

หลักการ เป็นการวัด BOH โดยอาศัยเอนไซม์ HBDH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน BOH ไปเป็น AcAc วัดปริมาณ NADH ที่ 340 นาโนเมตร วิธีนี้พบว่ามีกรรบกวนจากกรดแลคติก ซึ่ง

พยายามคิดหาทั้งวิธี Spectrophotometry
หรือ Fluorometry ทั้งการทำด้วยวิธีธรรมดา
และการใช้เครื่องวัดอินทรีย์ เพื่อทำให้สามารถ
ตรวจวัด BOH ได้ ส่วนใหญ่เป็นวิธีแบบ kinetic
มีหลักการคือ ใช้ β -hydroxybutyrate
dehydrogenase (HBDH, EC 1.1.1.30)
เป็นตัวย่อย BOH ที่ pH 8.5 ให้เป็น AcAc
โดยมี coenzyme NAD เปลี่ยนเป็น NADH ซึ่ง
อัตราการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของ NADH ที่ 340
นาโนเมตร จะแปรตามปริมาณ BOH ในสารตัว
อย่าง

แก้ไขได้โดยการทำ blank ซึ่งขี้นายาที่ไม่มี
เอนไซม์เติมในตัวอย่าง แล้วนำมาหักลบออก
นายาที่ขี้น

- 1) สารละลายเอนไซม์ ประกอบด้วย
0.1M Tris, pH 9.5 11.76 มล., 117 mM
NAD 2.38 มล. และ HBDH (3 kU/g) 25
มก./5 มล.

- 2) Blank reagent เตรียมเหมือน
สารละลายเอนไซม์ แต่ใช้น้ำกลั่นน้ำใส่แทน HBDH

- 3) สารมาตรฐาน ใช้ D,L-3-hydroxybutyrate (Boeringer Mannheim Corp., Cat No. 106569) 2.0 mmol/L.

วิธีทำ ปรับสภาวะของเครื่องไว้ ดังนี้

Sample size	20	μl
Sample and diluent	70	μl
Reagent volume	350	μl
Analyzer run emperature	37	°C
Wavelength	340	nm
Standard concn.	2.0	mmol/L
T ₀ , time interval	10	sec
Abnormal absorbance	0.25	A

Blank Auto
Test mode Term
Printout Conc
No. of prints calibrate 1
Test code 00

วิธีนี้ พบว่า มีความเป็นเส้นตรงถึง 2.5 มิลลิโมลต่อลิตร มีความไว 0.04 มิลลิโมลต่อลิตร ความแปรปรวนระหว่างวัน เมื่อทำเป็นเวลา 20 วันมีค่า 2 standard deviation เท่ากับ ± 0.04 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 0.13 มิลลิโมลต่อลิตร และเท่ากับ ± 0.10 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 2.58 มิลลิโมลต่อลิตร ความคงตัวของ BOH ในตัวอย่างเลือดและซีรัม ที่อุณหภูมิห้อง (22-26 °C) เมื่อเก็บไว้นาน 48 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณลดลง 4.1% และในตัวอย่างเลือดที่ผสมสารกันเลือดแข็งและสารป้องกัน การสลายตัวของน้ำตาล (sodium fluoride/oxalate) มีค่าลดลง 5.6% เมื่อเก็บไว้ 7

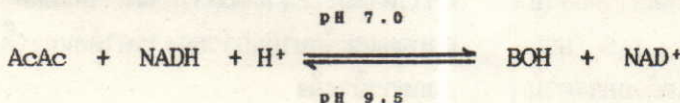
วัน ที่ 4 °C ซีรัมมีค่าเพิ่มขึ้น 5.3% และในพลาสมาที่มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถเก็บไว้ที่ 4 °C ได้อย่างน้อย 14 วัน

ค่าปกติของ BOH มีไม่เกิน 3.0 มิลลิโมลต่อลิตร จากคนทั่วไป 40 คน ที่ทดสอบปัสสาวะด้วย Ketostix ให้ผลลบ ระดับกลูโคสในซีรัมอยู่ในช่วง 66-108 มก./ดล. มีค่า BOH 0.04-0.48 มิลลิโมลต่อลิตร เฉลี่ย เท่ากับ 0.14 ± 0.14 มิลลิโมลต่อลิตร

สารกันเลือดแข็งที่ซี สามารถใช้ NaF/oxalate, heparin, NaF, potassium oxalate ได้ แต่ EDTA มีผลทำให้ระดับ BOH ต่ำกว่าปกติประมาณ 37%

2. วิธีหาอนุสารคีโตนทั้งหมด (Total ketone bodies, TKB)

โดยการรีดิวส์ AcAc ให้เป็น BOH ด้วย NADH ที่เติมลงในปฏิกิริยาให้ มากเกินพอ ที่ pH 7.0⁽¹⁵⁾



น้ำยาที่ใช้

- 1) สารละลาย HBDH 25 ยูนิตในน้ำกลั่น 1250 ไมโครลิตร สามารถเก็บไว้เป็นส่วนเล็ก ๆ ที่ -20 °C ได้นานอย่างน้อย 2 สัปดาห์
- 2) NADH (97% pure) 50 มก. ในน้ำปลอดไอออน 1710 ไมโครลิตร จะให้ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลต่อลิตร แบ่งเก็บไว้เป็นส่วนเล็ก ๆ ที่ -20 °C ได้นานอย่างน้อย 10 วัน
- 3) NAD⁺ ละลาย 20 มก. ในน้ำปลอดไอออน 1850 ไมโครลิตร จะให้ความเข้มข้น 16.2 มิลลิโมลต่อลิตร แบ่งเก็บเป็นส่วนเล็ก ๆ ไว้ที่ -20 °C

- 4) Phosphate buffer, pH 6.98 ผสม Na₂HPO₄ 0.2 มิลลิโมลต่อลิตร (28.4 กรัมต่อลิตร) 60 มล. กับ KH₂PO₄ 0.2 มิลลิโมลต่อลิตร (27.2 กรัมต่อลิตร) 40 มล.

สารละลาย ก. ผสม phosphate buffer 22.5 ไมโครลิตร กับ NADH 22.5 ไมโครลิตร และ HBDH 155 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันก่อนทำการทดสอบ ปริมาณที่ผสมนี้จะเพียงพอสำหรับการตรวจ 9 ตัวอย่าง และสารละลายผสมนี้จะคงตัวได้นาน 48 ชั่วโมง

สารละลาย ข. ผสม Tris buffer 420 ไมโครลิตร, NAD^+ 620 ไมโครลิตร และน้ำปลอดอียอน 560 ไมโครลิตร ก่อนทำการทดสอบ ปริมาณเพียงพอสำหรับการทดสอบ 9 ตัวอย่าง และสารละลายผสมนี้จะคงตัวได้นานอย่างน้อย 6 ชั่วโมง

5) Tris HCl buffer, pH 9.5 ละลาย tris(hydroxymethyl)aminomethane 60.5 กรัมในน้ำปลอดอียอน 800 มล. ปรับ pH ให้ได้ 9.5 แล้วเจือจางให้ครบลิตร

6) สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 200 มิลลิโมล/ลิตร มี AcAc 2.16 กรัม และ DL-BOH 2.52 กรัมในน้ำ 100 มล.

7) สารละลายมาตรฐานใช้งาน เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นให้เป็น 0, 0.5, 1, และ 2 มิลลิโมล/ลิตร ด้วยน้ำปลอดอียอน เติม oxamic acid ลงไปให้มีความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร เก็บแยกเป็นส่วนเล็กๆ ไว้ที่ -20°C ใช้ภายใน 6 เดือน

8) ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ เตรียม pooled serum 18.5 มล. เติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นลงไป 0.5 และ 1.5 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 20 มล. จะได้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่มี AcAc เป็น 5 และ 15 มิลลิโมล/ลิตร เติม oxamic acid ลงไปให้มีความเข้มข้นเป็น 1.5 กรัม/ลิตร เก็บแยกเป็นส่วนเล็กๆ ไว้ที่ -80°C ใช้ภายใน 1 สัปดาห์

วิธีทำ ใช้เครื่อง Multistat III Centrifugal Analyzer with Loader (MCA; Instrumentation Laboratory, Lexington, MA 02173) ทำดังนี้

ใส่ตัวอย่าง 2 ไมโครลิตร น้ำ 8 ไมโครลิตร สารละลาย ข. 20 ไมโครลิตรในหลุมของ Rotor ด้านใน และใส่สารละลาย ก. 160 ไมโครลิตร น้ำ 10 ไมโครลิตร เท่ากับ ± 0.04 มิลลิโมลต่อลิตร 2 standard deviation ใน

cuvette ของ rotor เดียวกัน ก่อน 30°C นาน 10 นาที แล้วเริ่มปั่นให้สารละลายทั้งหมดผสมกัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร เทียบกับน้ำกลั่น 10 วินาที และหลังจากนั้นอีก 2 นาที อ่านค่า BOH จากกราฟมาตรฐานที่เขียนขึ้นระหว่างค่าความเข้มข้นต่างๆ กัน ของ AcAc และค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปใน 2 นาทีที่อ่านได้

ข้อเสียด้าน

จะเห็นว่าวิธีต่างๆ ส่วนใหญ่ ใช้การอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ซึ่งไม่สะดวกสำหรับบางห้องปฏิบัติการ ดังนั้น อาจจะใช้วิธีการให้เกิดปฏิกิริยาต่อปฏิกิริยาเกิดสี โดยใช้ diaphorase และ INT system หรือ PMS - NBT system ทำให้เกิดสาร formazan ที่มีสีเกิดขึ้น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสงธรรมดาได้ ซึ่งปัจจุบัน ได้มีผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่ทำให้เกิดสีดังกล่าวมาบ้างแล้ว จึงสมควรที่จะพิจารณานำมาใช้ในการตรวจภาวะคีโตซิสนัมป่วยเบาหวาน หรือโรคอื่น ได้ โดยเฉพาะกรณีที่มีสารคีโตนเพียงระดับต่ำ จะทำให้นักแพทย์ทำการควบคุมและรักษาอาการของโรคได้ทันเวลาที่

เอกสารอ้างอิง

1. Persson B. Determination of plasma acetoacetate and D- β -hydroxybutyrate in newborn infants by an enzymatic fluorometric micro-method. Scand J Clin Lab Invest 1969; 25: 9-18.
2. Wildenhoff KE. Diurnal variations in the concentration of blood acetoacetate, 3-hydroxybutyrate and glucose in normal person. Acta Med Scand 1972; 191: 303-306.

3. Hansen JL, Freier EF. Direct assay of lactate, pyruvate, β -hydroxybutyrate and acetate with a centrifugal analyzer. Clin Chem 1978; 24: 475-479.
4. Koch DD and Feldbruegge H. Optimized kinetic method for automated determination of β -hydroxybutyrate. Clin Chem 1987; 33: 1761-1766.
5. MacGillivray MH, Li PK, Lee JT, et al. Elevated plasma β -hydroxybutyrate concentrations without ketonuria in healthy insulin-dependent diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab 1982; 54: 665-668.
6. Stephens JM, Sulway MJ, Watkins JP. Relationship of blood acetoacetate and 3-hydroxybutyrate in diabetics. Diabetes 1971; 20: 485-489.
7. Alberti KGMM, Hockaday TDR. Rapid blood ketone body estimation in the diagnosis of diabetic ketoacidosis. Br Med J 1972; ii: 565-568.
8. Harano Y, Kosugi K, Hyosu T, Uno S, Ichikawa Y, Shigeta Y. Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies. Clin Chim Acta 1983; 134: 327-336.
9. Cuthbert C, Alberti KGMM. Combined enzymatic assays for 3-hydroxybutyrate and lactate: end-point and kinetic methods. Clin Chim Acta 1978;90:179-186.
10. Moore JJ, Marcus M, Sax SM. Kinetic assay of β -hydroxybutyrate in plasma with a COBAS-BIO centrifugal analyzer. Clin Chem 1982; 28: 702-703.
11. McMurray CH, Blanchflower WJ, Rice DA. Automated kinetic method for D-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. Clin Chem 1984; 30: 421-425.
12. Harano Y, Kosugi K, Hyosu T, et al. Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies. Clin Chim Acta 183; 134: 327-336.
13. Foster DW, McGarry JD. The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. N Engl J Med 1983; 309: 159-169.
14. Custer EM, Myers JL, Poffenberger PL and Schoen I. The storage stability of 3-hydroxybutyrate in serum, plasma and whole blood. Am J Clin Pathol 1983; 80: 375-380.

Chanarat N

15. Nuwayhid NF, Johnson GF and Feld RD. Kinetic measurement of the combined concentrations of acetoacetate and β -hydroxybu-

tyrate in serum. Clin Chem 1988; 34: 1790-1793.

นันทยา ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาบาลวิชาชีพ)

ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ดรรชนีเรื่อง

การฝึกปฏิบัติ	53	โรคเอดส์	19, 25, 33, 45, 61
กลัยเคติอีมีโรกลิน	155	ลื้อเซิน	111
การวัดการกางและการเหยียด ของนิ้วหัวแม่มือ	51	ไวรัสตับอักเสบนับ	1
การฝึก CBC	91	สารคัดหลั่ง	169
คอมพิวเตอร์ช่วยสอน	121	APTT	11
คีโตซิส	169	Clq	121
เครื่องเขย่าใบเปิด	105	Enterbacteriaceae	149
เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน	59	Human leukocyte antigen	165
เครื่องอ่านไมโครเพลท	11	β -hydroxybutyrate	169
ผู้บริจาคโลหิต	25	Monoclonal antibody	161, 165
ผู้พิการ	111	PRT	11
ปัญหาประดิษฐ์	1	Serodiagnosis	121
		TT	11

ดรรชนีผู้เขียน

दन्य प्रजरीण	59	प्रतिपद्य वलमावलस	51,111
देखा रमलर्य	93	मारसल गोररजनलनल	149
दलरलक वलनननल	19,93	वलरगल सलसुसल	19,61
वलसुलक अकसरतल	105	वलसर गलललक	165
ठवल डलसलरलन	93	वलवलथल गेसलरलसनन	149
ननलल सनलरलन	1,11,155,169	सनल खलरलसल	19,53
प्रलु प्रलुननल	93	सलसुलक जनननल	105
प्रसलक देल	105	सुलल गललल	93
प्रसललल सनलरलन	1,11,19,55,61, 93,141,155	ललल सलसुल	161
प्रसललल ठलवलललल	149	सलसर सलनललल	155
प्रलललल ललललल	25	नलखल सललल	105
नललल गललल	33,45	अललरलन रललल	93
		Fumiaki Taguchi	121