

สภาวะคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูปเอ็นไซม์อิมมิวโนเอสเสย์และ
เรดิโออิมมิวโนเอสเสย์
Stability of enzymeimmunoassay and radioimmunoassay kits

กัลยาณี ตันตองฆาร* นัศรพร อุษณาจิตต์** พูนภริมย์ ลิปตพัลลภ***

Abstract : Tunsaringkarn K, Usanachitt C, and Liptapanlop P. 1991. Stability of enzymeimmunoassay and radioimmunoassay kits. Thai J Hlth Resch 5(1) : 49 - 53

Enzymeimmunoassay kits (BioMerieux and Serono) and radioimmunoassay kit of WHO used to assay luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), prolactin (PRL) and progesterone (P). The reagent kits were divided into 3 groups which kept at 40°C (group 1), exposed to 40°C for 2 weeks (group 2) and kept at 4°C (group 3) but assayed after expired date 1 month. The stability of kits expressed in term of the percentage different between the hormonal results obtained by kits group 1 and 2 or 3. The results of stability after exposed 40°C for 2 weeks showed that BioMerieux, Serono and WHO was $-19.48 + 0.98$ and $+9.81$ respectively. Whereas the results of stability which kept at 4°C and assayed after expired date 1 month showed that BioMerieux was $+20.08$ and Serono was $+61.87$.

บทคัดย่อ : กัลยาณี ตันตองฆาร, นัศรพร อุษณาจิตต์ และ พูนภริมย์ ลิปตพัลลภ. 2534. สภาวะคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูปเอ็นไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5(1) : 49 - 53

น้ำยาสำเร็จรูปเอ็นไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ (BioMerieux และ Serono) และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ของ WHO ใช้หาปริมาณฮอร์โมนในซิงฮอร์โมน (LH) ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (FSH) โพรแลคติน (PRL) และโปรเจสเตอโรน (P) โดยแบ่งน้ำยาสำเร็จรูปออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เก็บน้ำยาสำเร็จรูปที่อุณหภูมิ 4°C กลุ่มที่ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และกลุ่มที่ 3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และทำการทดลองหลังจากเลยกำหนดอายุการใช้งาน 1 เดือน การศึกษาสภาวะการคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูปคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของระดับฮอร์โมนกลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 2 หรือ 3 ผลสภาวะคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูปที่เก็บไว้ที่ 40°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ของ BioMerieux, Serono และ WHO มีค่า $-19.48 + 0.98$ และ $+9.81$ ตามลำดับ ในขณะที่สภาวะคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูปที่เก็บไว้ที่ 4°C แต่ทำการทดลองหลังจากเลยกำหนดอายุการใช้งาน 1 เดือน ของ BioMerieux มีค่า $+20.08$ และ Serono มีค่า $+61.87$

* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330

Institute of Health Research, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

** ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330

Dept of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

*** ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์ พระมงกุฎเกล้า กทม. 10400

Dept of Biochemistry, Pramongkutklao Medical College, Bangkok 10400.

บทนำ

สภาวะไม่คงตัวของชีวโมเลกุลจะขึ้นกับปัจจัยหลายประการ (Bangham, 1982) ได้แก่

1. การดูดซับผิวสาร (adsorption onto surfaces)
2. การเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของโมเลกุล (molecular configuration)
3. ชีวโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ (ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากเนื้อเยื่อหรือแบคทีเรีย) ปฏิกริยาออกซิเดชัน ความเป็นกรดต่างที่ไม่เหมาะสม ความชื้นและความร้อนในสารบางชนิด แสงอาจจะเป็นตัวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และจะมีสภาวะคงตัวมากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ ๆ

สำหรับสารจำพวกสารมาตรฐานเพื่อให้มีสภาวะคงตัวมากที่สุด จะเก็บในลักษณะแห้งขณะที่ยังเยือกแข็ง (freeze-dried) แล้วบรรจุในขวดที่ใส่ก๊าซเฉื่อย เช่น ไนโตรเจน ที่ปิดสนิทเก็บไว้ในที่มืด และอุณหภูมิต่ำ (-20°C) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพเมื่อมีการขนส่งทางอากาศ (Jeffcoate *et al.*, 1982) แต่ในทางปฏิบัติสารต่าง ๆ ส่วนใหญ่ที่ส่งซื้อมาจากต่างประเทศ อาจจะไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ทุกขั้นตอน ซึ่งอาจจะมีผลต่อคุณภาพของสารนั้น ๆ นอกจากนี้อายุการใช้งานของสารก็มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของสารในการทดลองต่าง ๆ จุดประสงค์ของการทดลองนี้ ต้องการศึกษาสภาวะคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูป ที่ใช้ในวิธีการเอนไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ ต่ออุณหภูมิและอายุการใช้งาน เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูปเหล่านี้ ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ ตามวิธีการที่กำหนด (Sufi *et al.*, 1987; BioMerieux, 1986; Serono diagnostics, 1988)

วัตถุประสงค์และวิธีการ

วัสดุ

น้ำยาสำเร็จรูปเอนไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ของ BioMerieux และ Serono และน้ำยาสำเร็จรูปเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ของ WHO Match Reagent (MR) ตลอดจนสารตัวอย่าง และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ได้รับความช่วยเหลือจากองค์การอนามัยโลก (WHO)

วิธีการ

การเก็บน้ำยาสำเร็จรูปเอนไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ จัดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 น้ำยาสำเร็จรูปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน LH FSH PRL และ P ตามวิธีการเอนไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ของ BioMerieux และ Serono และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ของ WHO MR

กลุ่มที่ 2 น้ำยาสำเร็จรูปที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน LH FSH PRL และ P ตามวิธีการเอนไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ของ BioMerieux และ Serono และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ของ WHO MR

กลุ่มที่ 3 น้ำยาสำเร็จรูปที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และเลยกำหนดอายุการใช้งาน 1 เดือน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน LH FSH PRL และ P ตามวิธีการเอนไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ของ BioMerieux และ Serono สำหรับน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในวิธีการเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์มีอายุการใช้งานเป็นปี จึงไม่นำมาทำการทดสอบ

สภาวะการคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูป เอนไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ คำนวณจากการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ฮอร์โมนต่าง ๆ ในกลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 2 หรือ 3 โดยใช้สูตร

$$\text{Hormonal difference (\%)} = \left[\frac{y}{x} \cdot 100 \right] - 100$$

x = ปริมาณฮอร์โมนที่วิเคราะห์จากน้ำยาสำเร็จรูป กลุ่มที่ 1

y = ปริมาณฮอร์โมนที่วิเคราะห์จากน้ำยาสำเร็จรูป กลุ่มที่ 2 หรือ 3

ผล

จากการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูป จากผลการวิเคราะห์ฮอร์โมนต่าง ๆ ด้วยวิธีการเอ็นไซม์อิมมูโนเอสเสย์ และเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ โดยทำการทดลองกลุ่มละ 2 ครั้ง ๆ ละ 16 ตัวอย่าง พบว่า

1. สภาวะคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูปที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนต่าง ๆ ของ BioMerieux, Serono และ WHO มีค่า -19.48 ± 0.94 และ $+9.81$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1
2. สภาวะคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูปที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และเลขกำหนดอายุการใช้งาน 1 เดือน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนต่าง ๆ ของ BioMerieux และ Serono มีค่า $+20.08$ และ $+61.87$ ดังแสดงในตารางที่ 2

Table I. Results of hormonal difference (%) of enzymeimmunoassay and radioimmunoassay kits after exposed to 40°C for 2 weeks.

Hormones	Hormonal difference (%)		
	BioMerieux	Serono	WHO MR
LH	- 11.92	+ 12.81	+ 4.24
FSH	- 3.35	+ 5.55	+ 12.92
PRL	- 62.10	- 0.61	+ 12.27
P	- 0.54	- 13.98	—
Overall mean	- 19.48	+ 0.94	+ 9.81

Table II. Results of hormonal difference (%) of enzymeimmunoassay kits which kept at 4°C and assayed after expired date 1 month.

Hormones	Hormonal difference (%)	
	BioMerieux	Serono
LH	+ 83.08	- 2.83
FSH	+ 15.63	- 17.94
PRL	+ 9.92	+ 205.39
P	- 28.33	+ 62.84
Overall mean	+ 20.08	+ 61.87

วิจารณ์

จากผลระดับฮอร์โมนต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดยน้ำยาสำเร็จรูปเอ็นไซม์อิมมูโนเอสเสย์ และเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาสำเร็จรูปที่เก็บไว้ที่ 4°C จะเห็นว่า ผลของการวิเคราะห์เปลี่ยนแปลงไปไม่มากนัก (ตารางที่ 1) แสดงว่า น้ำยาสำเร็จรูปทั้งสามชนิดค่อนข้างจะมีสภาวะคงตัวสูง ถึงแม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C แต่น้ำยาสำเร็จรูปของ Serono ค่อนข้างจะให้ผลดีกว่าของ WHO MR และ BioMerieux นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าผลของอุณหภูมิสูง ๆ จะทำให้ค่า optical absorbance ลดลงในวิธีการเอ็นไซม์อิมมูโนเอสเสย์

ของ BioMerieux และ Serono ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าปฏิกิริยาของเอ็นไซม์จะมีผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไอออน (ionic strength) ตัวยับยั้ง (inhibitor) ตัวกระตุ้น (activator) หรือ โปรตีนในสารละลายชีววิทยา (biological fluid) ซึ่งจะทำให้ลดความไว (sensitivity) ในการวัด (Tijssen, 1985)

สำหรับผลระดับฮอร์โมนต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดยน้ำยาสำเร็จรูปเอ็นไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ เมื่อเก็บที่ 4°C แต่นำมาวิเคราะห์หลังจากเลยกำหนดอายุการใช้งาน 1 เดือน จะเห็นว่ามีความแตกต่างกันมากระหว่างน้ำยาสำเร็จรูป BioMerieux และ Serono (ตารางที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำยาสำเร็จรูป BioMerieux ก่อนข้างจะมีสภาวะคงตัวมากกว่า Serono ซึ่งในวิธีการของ Serono ก่อนข้างจะเน้นถึงการเสื่อมคุณภาพของน้ำยาสำเร็จรูป โดยสังเกตจากลักษณะการเปลี่ยนสีของสับสเตรท จากสีเหลืองอ่อนไปเป็นสีชมพูหรือแดง หรือความชื้นในสารมาตรฐาน หรือสารควบคุม (control) เป็นต้น นอกจากนี้ยังห้ามมีการสับเปลี่ยนของสารเคมีในน้ำยาสำเร็จรูปแต่ละชุด และห้ามใช้น้ำยาสำเร็จรูปเกินเวลาที่กำหนด

ดังนั้น จากการศึกษาสภาวะการคงตัวของน้ำยาสำเร็จรูปดังที่ได้กล่าวมาแล้ว พอที่จะสรุปได้ว่า น้ำยาสำเร็จรูปเอ็นไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ก่อนข้างจะมีสภาวะคงตัวที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ส่วนน้ำยาสำเร็จรูปเอ็นไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ของ BioMerieux จะมีสภาวะการคงตัว เมื่อเก็บที่ 4°C แม้จะเกินอายุที่กำหนด 1 เดือนดีกว่าของ Serono ซึ่งจะให้ผลการวิเคราะห์สูงกว่าความเป็นจริงเกิน 50% ทำให้ผลระดับฮอร์โมนผิดพลาดมากเมื่อนำผลการวิเคราะห์มาใช้ในทางการแพทย์

วิธีการเอ็นไซม์อิมมิวโนเอสเสย์ และเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ เป็นวิธีการที่ใช้กันมากในการวิเคราะห์สารต่าง ๆ ในร่างกาย ดังนั้นคุณภาพในการวิเคราะห์จึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อให้ผลในการวิเคราะห์ถูกต้อง และนำไปใช้ในการแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในปี 1978 Hall ได้รายงานว่าคุณภาพในการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบหลายประการ ดังนี้

1. คุณภาพของ primary reagents 3 อย่างคือ สารมาตรฐาน แอนติซีรัม (antiserum) สารกัมมันตรังสี (tracer) หรือเอ็นไซม์ และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น
2. คุณภาพของ secondary reagents เช่น บัฟเฟอร์ และส่วนประกอบ reagent ที่ใช้สำหรับการแยก complex หรือทำให้เกิดสี
3. คุณภาพของเครื่องมือ และวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์

ดังนั้นห้องปฏิบัติการต่าง ๆ มีความจำเป็นต้องควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ให้ถูกต้อง แม่นยำ เพื่อที่แพทย์จะสามารถนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ในการวินิจฉัย และรักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้อง (สุกัญญา, 2525) นอกจากนี้การควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ ยังช่วยให้เราพิจารณาเลือกวิธีการวิเคราะห์ว่าวิธีไหนดี หรือคุณภาพของน้ำยาที่ใช้วิเคราะห์ยังสามารถใช้ได้หรือไม่ เมื่อมีปัญหาเกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

สุกัญญา วีรวัฒน์กมลพะ. 2525. Quality control setting: การฝึกอบรมทางห้องปฏิบัติการเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 19-30 กรกฎาคม 2525. ภาควิชาสถิติศาสตร์- นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : 135- 150.

Bangham DR. 1982. Standardization and standard. In: Radioimmunoassay design and quality control, edited by Jan I Thorell. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt: 59-67.

BioMerieux clinical chemistry hormones. 1986.

- Hall PE. 1978. Assay Method Manual in WHO programmes for the provision of matched assay reagent for the radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology. Second edition, Geneva, Switzerland.
- Jeffcoate SL, Sufi SB, Hall PE, and Goncharov N. 1982. World Health Organization program for standardization of hormone radioimmunoassays in reproductive endocrinology. In: Radioimmunoassay design and quality control, edited by Jan I Thorell. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt: 133-145.
- Serono diagnostics, 1987-1988.
- Sufi SB, Danaldson A, and Jeffcoate SL. 1987. Programme for the provision of matched assay reagent for the radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology. WHO Special Programme of Research Development and Research Training in Human Reproductive. Eleventh edition, Geneva, Switzerland.
- Tijssen P. 1985. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. In: Practice and theory of enzyme immunoassay. Edited by RH Burdon and PH Knippenberg. Amsterdam, New York, Oxford. Vol 15: 9-20.