

# การประยุกต์ใช้น้ำยาที่เตรียมเองสำหรับตรวจหาปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ และน้ำไขสันหลังโดยวิธี Benzethonium chloride กับเครื่องอัตโนมัติ Hitachi 704

วรรณิ ชยานันต์นุกูล<sup>1</sup>

## Abstract:

Application of a self-prepared benzethonium chloride reagent for protein determination in urine and cerebrospinal fluid on Hitachi 704 automatic analyzer

Chayanunnukul W.

Department of Pathology, Faculty of Medicine,

Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand

Songkla Med J 2005;23(5):313-320

*A self-prepared benzethonium chloride reagent for determination of protein in urine and cerebrospinal fluid (CSF) was prepared and evaluated. The accuracy, precision, detection limit, linearity and stability of the reagent were studied on a Hitachi 704 automatic analyzer. For accuracy, the average recovery of the self-prepared reagent and the commercial reagent were 95.4% and 98.0% respectively. The precision was evaluated by analyzing two levels of urine control. It was found that the within-run and the between-run coefficients of variation (%CV) of the self-prepared reagent were 1.8% to 3.9% and 1.8% to 3.8% respectively, whereas those of the commercial reagent were 1.4% to 3.9% and 1.5% to 3.8% respectively. The self-prepared reagent and the commercial reagent gave the same detection limit and linearity of 2.0 mg/dL and 200 mg/dL respectively. The correlation (r) of protein determination in 200 urine and CSF patient samples was 0.9990 ( $y = 0.996X + 0.356$ ) with no significant difference ( $p > 0.05$ ) found. A self-prepared reagent was stable for at least 6 months when stored*

---

<sup>1</sup>วท.บ. (วิทยาศาสตร์สุขภาพ), วท.ม. (วิทยาศาสตร์สุขภาพ) นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110  
รับต้นฉบับวันที่ 22 ธันวาคม 2547 รับลงตีพิมพ์วันที่ 7 กรกฎาคม 2548

in a refrigerator at 4 °C. The cost per test of this reagent is about 300-fold less than that of the commercial reagent. In conclusion, the self-prepared reagent gave satisfactory score for protein determination, and was determined to be as good as a commercial reagent and is applicable for routine protein determination in the clinical chemistry laboratory.

**Key words:** cerebrospinal fluid, urine, self-prepared reagent, commercial reagent

## บทคัดย่อ:

ผู้วิจัยได้ประเมินคุณภาพน้ำยา benzethonium chloride ที่เตรียมเอง ซึ่งเป็นน้ำยาสำหรับตรวจหาปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ และน้ำไขสันหลังเปรียบเทียบกับน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท โดยการศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ความเที่ยงตรง (precision) ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (detection limit) ค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด (linearity) และศึกษาความคงตัวของน้ำยา (stability) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 704 ผลจากการศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ของน้ำยาที่เตรียมเอง ได้ค่า percent recovery เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 95.4 ส่วนน้ำยาสำเร็จรูปได้ค่า percent recovery เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 98.0 การศึกษาความเที่ยงตรง (precision) เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) โดยใช้สารควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ พบว่าน้ำยาเตรียมเองมีความเที่ยงตรงชนิด within-run เท่ากับร้อยละ 1.8 ถึง 3.9 และชนิด between-run เท่ากับร้อยละ 1.8 ถึง 3.8 ส่วนน้ำยาสำเร็จรูปมีความเที่ยงตรงชนิด within-run เท่ากับร้อยละ 1.4 ถึง 3.9 และชนิด between-run เท่ากับร้อยละ 1.5 ถึง 3.8 ตามลำดับ น้ำยาทั้งสองชนิดให้ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (detection limit) และค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด (linearity) เท่ากัน คือ 2.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วย 200 ราย โดยทดสอบในน้ำยาทั้งสองชนิด พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี คือ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9990 ( $y = 0.996x + 0.356$ ) และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) น้ำยาที่เตรียมเองสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นไว้ใช้ได้ยาวนานอย่างน้อย 6 เดือน เมื่อเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายพบว่าน้ำยาที่เตรียมเองมีราคาต้นทุนต่อหนึ่งการทดสอบต่ำกว่าน้ำยาสำเร็จรูป 300 เท่า สรุปได้ว่าน้ำยาที่เตรียมเองมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจวัดโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลังในการตรวจวิเคราะห์ประจำวันของห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก เนื่องจากน้ำยาที่เตรียมเองมีต้นทุนราคาน้ำยาต่ำกว่าและการศึกษาคุณสมบัติของน้ำยาให้ผลที่ไม่แตกต่างจากน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท

**คำสำคัญ:** น้ำไขสันหลัง, ปัสสาวะ, น้ำยาเตรียมเอง, น้ำยาสำเร็จรูป

## บทนำ

การตรวจวัดระดับของโปรตีนในปัสสาวะเป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่มีความสำคัญในการประเมินภาวะการทำงานของไต และวินิจฉัยโรคไตในภาวะต่างๆ ที่ไตถูกทำลาย หรือทำให้มีการขับโปรตีนจากไตออกมาในปัสสาวะมากกว่าปกติ เช่น โรคไตอักเสบ (nephritis) โรคไตแบบเนฟโรติก (nephrosis) หรือโรคไตที่มีสาเหตุจากการเป็นโรคเบาหวาน (diabetic nephropathy)<sup>1-5</sup> ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลมาจากความผิดปกติในหน่วยกรองโกลเมอรูลัส<sup>2</sup> และสาเหตุการได้รับจากสารพิษจากโลหะหนักหรือยาบางชนิดที่เป็นพิษต่อไตทำให้เกิดความผิดปกติในกลุ่มของ tubular proteinuria และกรณีนอกเหนือจากโรคไตแล้ว ยังพบว่าการไหลเวียนของเลือดจากไตที่ไม่สะดวก ทำให้ตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะได้ เช่น ภาวะ renal vein thrombosis และภาวะ con-

gestive heart failure นอกจากนี้ถ้ามีการอักเสบหรือการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะสามารถตรวจพบภาวะ proteinuria ได้ ในภาวะเครียดหรือการออกกำลังกายมากเกินไปจะตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะได้ แต่ในกรณีที่ตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะอยู่เสมอ นับว่ามีความสำคัญมาก เพราะเป็นสัญญาณบ่งชี้ว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นกับผู้ป่วย<sup>2, 4</sup>

ส่วนการตรวจวัดโปรตีนในน้ำไขสันหลังมีความสำคัญและช่วยในการวินิจฉัยโรคทางระบบประสาท เช่น โรคเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังอักเสบ (meningitis) ภาวะเลือดออกในสมอง (cerebral hemorrhage) หรือภาวะเลือดออกใต้เยื่อหุ้มสมอง (subarachnoid hemorrhage)<sup>1-2, 6</sup>

วิธีการตรวจวัดโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลังที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปจะมี 2 หลักการ คือ ใช้วิธีวัดความเข้มข้นที่

เกิดจากปฏิกิริยา (dye-binding method) และวิธีวัดความขุ่น (turbidimetric method)<sup>7-8</sup> โดยทั้งสองหลักการสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ซึ่งข้อเสียของหลักการวัดความเข้มสีที่เกิดจากปฏิกิริยาพบว่ามีความจำเพาะและความเที่ยงตรงค่อนข้างต่ำ บางวิธีต้องผ่านขั้นตอนการทำให้โปรตีนในปัสสาวะมีความเข้มข้นมากขึ้น และอีกกรณีอาจเกิดคลาดเคลื่อนได้จากสารที่ไม่ใช่โปรตีนแต่สามารถจับกับสีได้<sup>7</sup> ส่วนหลักการวัดความขุ่นเป็นวิธีที่ง่ายและมีความไวสูง การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธี benzethonium chloride ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยหลักการวัดความขุ่น และเป็นวิธีที่มีความไวต่อการตรวจหาปริมาณโปรตีนระดับต่ำในปัสสาวะได้<sup>9-10</sup> วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อประเมินคุณภาพน้ำยาที่ใช้ตรวจวัดโปรตีนในปัสสาวะ และน้ำไขสันหลังของน้ำยาที่เตรียมเองเปรียบเทียบกับน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท ซึ่งใช้วิธี benzethonium chloride เช่นเดียวกัน และการประยุกต์ใช้น้ำยาที่เตรียมเองทดแทนการสั่งซื้อน้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัท เนื่องจากน้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัทมีราคาค่อนข้างแพงเมื่อคำนวณราคาสารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาพบว่าน้ำยาที่เตรียมเองราคา 0.05 บาทต่อหนึ่งการทดสอบ ในขณะที่น้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัทต้นทุนราคา 15 บาทต่อหนึ่งการทดสอบ (ราคาปี พ.ศ. 2546) โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างปัสสาวะที่ส่งมาตรวจหาระดับโปรตีนในแต่ละวันของหน่วยเคมีคลินิกเพิ่มจำนวนมากขึ้นทุกวัน (เฉลี่ยประมาณ 50 รายต่อหนึ่งวัน) เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและลดการสั่งซื้อน้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัท

## วัสดุและวิธีการ

### 1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

1.1 ตัวอย่างเป็นปัสสาวะและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยจากหน่วยเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 200 ตัวอย่าง (ตัวอย่างปัสสาวะ 150 ราย และตัวอย่างน้ำไขสันหลัง 50 ราย)

1.2 สารควบคุมคุณภาพ (control urine protein) ของบริษัท BIO-Rad

### 2. น้ำยาตรวจหาปริมาณโปรตีน

2.1 น้ำยาตรวจวัดโปรตีนที่เตรียมเอง (self-prepared reagent) ประกอบด้วย

- reagent 1 ประกอบด้วย NaOH 530 มิลลิโมลต่อลิตร, EDTA-Na 74 มิลลิโมลต่อลิตร, 0.5% Polyethylene glycol 200 และ 0.5% Triton X-100

- reagent 2 ประกอบด้วย benzethonium chloride 32 มิลลิโมลต่อลิตร, 0.5% Polyethylene glycol 200 และ 0.5% Triton X-100

2.2 น้ำยาตรวจวัดโปรตีนโดยวิธี benzethonium chloride ชนิดสำเร็จรูปของบริษัท Roche Cat. No. 1877801 ประกอบด้วย

- reagent 1 ประกอบด้วย NaOH 530 มิลลิโมลต่อลิตร, EDTA-Na 74 มิลลิโมลต่อลิตร

- reagent 2 ประกอบด้วย benzethonium chloride 32 มิลลิโมลต่อลิตร

## วิธีการศึกษา

1. การทดสอบคุณสมบัติของน้ำยาเตรียมเองและน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจวัดโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลังกับเครื่องอัตโนมัติ Hitachi 704

1.1 การทดสอบความถูกต้อง (accuracy) โดยหาค่า percent recovery โดยการเติมสารมาตรฐานโปรตีน (human protein standard) ของบริษัท Sigma ที่ทราบค่าความเข้มข้นแน่นอนลงไปในตัวอย่างเป็นปัสสาวะที่ได้ทำการตรวจวัดค่าโปรตีนไว้ก่อนแล้ว หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดปริมาณโปรตีนอีกครั้งแล้วหาร้อยละที่ recover ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จะหาค่า percent recovery ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่เติมลงไปสามระดับ คือ 5.0, 20.0 และ 80.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในแต่ละระดับนำไปตรวจหาค่าโปรตีน 4 ครั้งแล้วนำค่าเฉลี่ยไปหา percent recovery<sup>11</sup>

### 1.2 การทดสอบความเที่ยงตรง (precision)

1.2.1 ความเที่ยงตรงชนิด within-run โดยนำสารควบคุมคุณภาพ (control urine protein) บริษัท BIO-Rad ตัวอย่างเดียวกันไปตรวจวัดค่าโปรตีนซ้ำๆ กันจำนวน 20 ครั้งภายในวันเดียวกัน แล้วดูค่าที่ได้ว่าใกล้เคียงกันมากน้อยเพียงใด โดยการนำไปหาร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ซึ่ง percent CV = 100 x (SD/mean) การศึกษาครั้งนี้ได้หาความแม่นยำชนิด within-run ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 ระดับ (ระดับต่ำและระดับสูง)

1.2.2 ความเที่ยงตรงชนิด between-run โดยนำสารควบคุมคุณภาพ (control urine protein) ของบริษัท BIO-Rad ตัวอย่างเดียวกันแบ่งออกเป็น 20 ส่วน นำไปแช่แข็งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำออกมาตรวจวัดค่าโปรตีนวันละส่วนเป็นเวลา 20 วัน นำผลที่ได้ไปหา percent CV การศึกษาครั้งนี้ได้หาความแม่นยำชนิด between-run ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 ระดับ (ระดับต่ำและระดับสูง)

1.3 การหาค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (detection limit) เป็นการศึกษาค่าโปรตีนระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยได้ค่าแตกต่างจากศูนย์<sup>12</sup> ทำโดยการตรวจวัดโปรตีนในสารละลาย normal saline (0.9% NaCl) ที่เตรียมเองและมีค่าความเข้มข้น

ของโปรตีนเท่ากับศูนย์ ทำการทดสอบซ้ำๆ จำนวน 20 ครั้ง นำค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งหมดมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แล้วคำนวณค่าต่ำสุดที่วัดได้จากอัตรา การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเท่ากับค่าเฉลี่ยบวกสามเท่าของ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean+3SD) ซึ่งค่าต่ำสุดที่สามารถ ตรวจวัดได้โดยมีค่าแตกต่างจากศูนย์ถือเป็น detection limit<sup>9</sup>

1.4 การทดสอบค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) เป็นการศึกษาค่าสูงสุดที่วัดได้โดยใช้สารมาตรฐานโปรตีน (human protein standard) ของบริษัท Sigma โดยนำมาเจือจางด้วย สารละลาย normal saline (0.9% NaCl) ให้ได้ความเข้มข้นของ โปรตีน 10, 20, 40, 80, 200, 250, 300 และ 400 มิลลิกรัม ต่อเดซิลิตร นำไปตรวจวัดโปรตีน โดยทำซ้ำสองครั้งแล้วหาค่า เฉลี่ย ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่เป็นเส้นตรงคือค่าสูงสุดที่สามารถ วัดได้

2. การหาความสัมพันธ์และเปรียบเทียบผลการตรวจวัด โปรตีนของน้ำยาเตรียมเองกับน้ำยาสำเร็จรูป

โดยการตรวจวัดค่าโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะและ น้ำไขสันหลัง จำนวน 200 ราย (ตัวอย่างปัสสาวะ 150 ราย และ น้ำไขสันหลัง 50 ราย) ตัวอย่างทั้งหมดมีค่าโปรตีนครอบคลุม ตั้งแต่ค่าต่ำจนถึงค่าสูง แล้วนำไปตรวจวัดค่าโปรตีนด้วยเครื่อง วิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi 704 โดยใช้น้ำยาที่เตรียมเองและน้ำยา สำเร็จรูปทดสอบพร้อมกัน นำผลที่ตรวจวัดได้ไปทดสอบหาความ สัมพันธ์กันโดยการทดสอบสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear

regression analysis) และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์โดยใช้ Pearson's correlation coefficient และนำไปทดสอบความแตกต่างของ การตรวจวัดปริมาณโปรตีนของน้ำยาทั้งสองชนิดด้วยวิธีของ Bland และ Altman<sup>13</sup>

3. การทดสอบความคงตัว (คงสภาพ) ของน้ำยาที่ เตรียมเอง ทำโดยนำน้ำยาที่เตรียมเองมาตรวจวัดค่าโปรตีนโดยใช้ สารควบคุมคุณภาพ (control urine protein) ของบริษัท BIO-Rad ที่มีค่าความเข้มข้นของโปรตีน 2 ระดับ (ระดับต่ำและสูง) และ ตรวจวัดค่าโปรตีนเป็นระยะๆ (ภายใน 6 เดือน) นำผลที่ตรวจวัด ได้ทั้งหมดไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบกับค่าโปรตีนที่ บริษัทกำหนดไว้ในเอกสารหากผลการตรวจวัดโปรตีนในสาร ควบคุมคุณภาพทั้งสองระดับยังอยู่ในช่วงค่าที่กำหนดแสดงว่า น้ำยานั้นยังใช้ได้

### ผลการศึกษา

จากการศึกษาคุณสมบัติของน้ำยาทั้งสองชนิดนั้น ให้ผล การทดสอบความถูกต้อง (accuracy) โดยการหาค่า percent recovery ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโปรตีนที่เติมลงไป 5.0, 20.0 และ 80.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร พบว่าน้ำยาที่เตรียมเองได้ค่า percent recovery เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 95.4 ส่วนน้ำยาสำเร็จรูป ของบริษัทได้ค่า percent recovery เท่ากับร้อยละ 98.0 (แสดงใน ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความถูกต้อง (accuracy) ของน้ำยาเตรียมเองและน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ตรวจวัดปริมาณโปรตีนใน ปัสสาวะและน้ำไขสันหลัง โดยการหา percent recovery

ค่าโปรตีนที่วัดได้ (มก. ต่อ ดล.)	ความเข้มข้นของโปรตีนที่เติม (มก. ต่อ ดล.)	ความเข้มข้นที่ recover ได้ (มก. ต่อ ดล.)	percent recovery
<b>น้ำยาเตรียมเอง</b>			
30.0			
34.5	5.0	4.5	90.0
49.0	20.0	19.0	95.0
111.0	80.0	81.0	101.2
น้ำยาเตรียมเอง มีค่า percent recovery เฉลี่ยเท่ากับ			95.4
<b>น้ำยาสำเร็จรูป</b>			
30.0			
34.7	5.0	4.7	94.0
49.5	20.0	19.5	97.5
112.0	80.0	82.0	102.5
น้ำยาสำเร็จรูป มีค่า percent recovery เฉลี่ยเท่ากับ			98.0

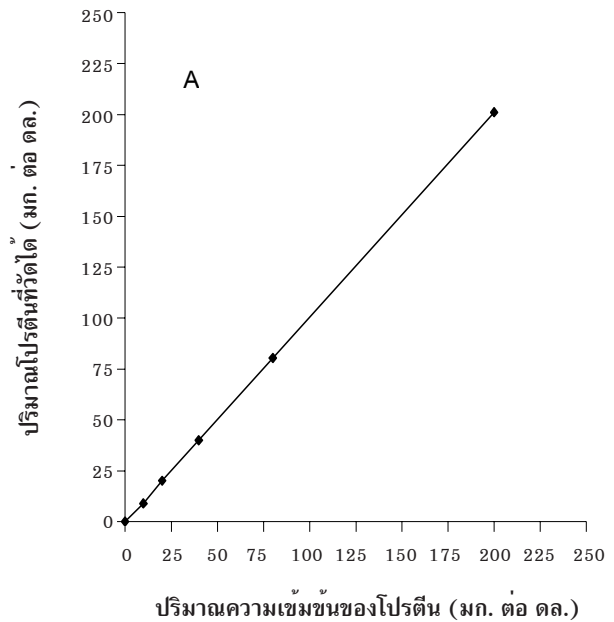
การศึกษาความเที่ยงตรง (precision) ของสารควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ (ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนระดับต่ำและสูง) พบว่าน้ำยาเตรียมเองได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ชนิด within-run เท่ากับร้อยละ 1.8 และ 3.9 ส่วนชนิด between-run เท่ากับร้อยละ 1.8 และ 3.8 ส่วนน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัทได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ชนิด within-run เท่ากับร้อยละ 1.4 และ 3.9 ส่วนชนิด between-run เท่ากับร้อยละ 1.5 และ 3.8 (แสดงในตารางที่ 2)

ในการทดสอบค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของน้ำยาทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากัน คือ 2.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และการทดสอบความเป็นเส้นตรงของน้ำยาเตรียมเองและน้ำยาสำเร็จรูปได้ค่าเท่ากัน คือ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (แสดงในรูปที่ 1 และ 2)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาโดยใช้น้ำยาที่เตรียมเองและน้ำยาสำเร็จรูปตรวจหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะและน้ำไขสันหลังรวม 200 ราย พบว่าน้ำยาทั้งสองชนิดให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ น้ำยาทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์ในระดับที่ดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์  $r = 0.9990$  ( $p > 0.05$ ) สมการถดถอยเชิงเส้นตรง  $y = 0.996X + 0.356$  และมีค่า bias ของทั้งสองวิธีเท่ากับ 0.095 (แสดงในรูปที่ 3) เปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณโปรตีนของน้ำยาทั้งสองชนิดพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของน้ำยาทั้งสองชนิดเท่ากับ  $0.015 \pm 2.0$  (แสดงในรูปที่ 4)

ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยา benzethonium chloride ที่เตรียมเองโดยนำสารควบคุมคุณภาพ (control urine protein)

ของบริษัท BIO-Rad ที่มีค่าความเข้มข้นของโปรตีน 2 ระดับ (ระดับต่ำและสูง) ตรวจวัดค่าโปรตีนเป็นระยะๆ พบว่าผลการตรวจวัดค่าโปรตีนในสารควบคุมคุณภาพทั้งสองระดับยังอยู่ในช่วงค่าที่บริษัทกำหนด (แสดงในตารางที่ 3)

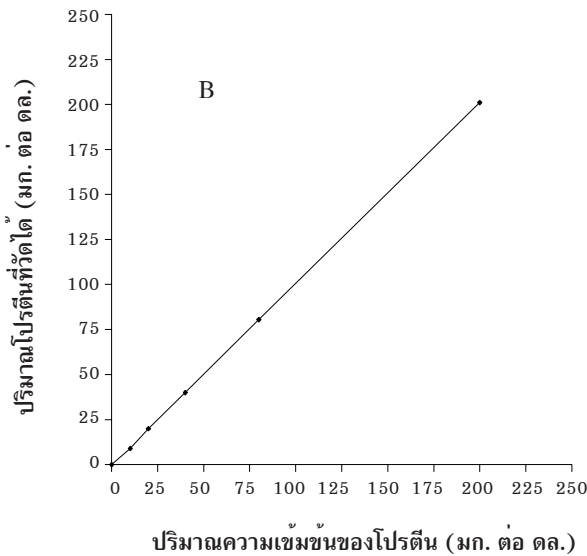


รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของน้ำยาเตรียมเอง (A) ที่ใช้ตรวจหาโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะและน้ำไขสันหลัง

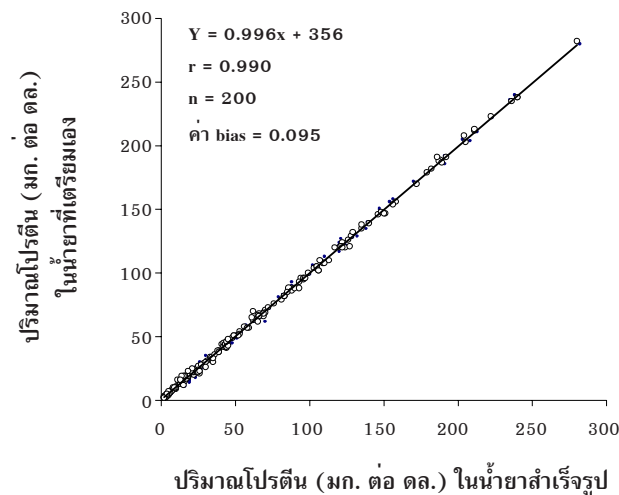
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงตรง (precision) ของน้ำยาเตรียมเองและน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลัง

	ความเที่ยงตรงชนิด within-run			ความเที่ยงตรงชนิด between-run		
	โปรตีน (มก./ดล.)			โปรตีน (มก./ดล.)		
	Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
<b>น้ำยาเตรียมเอง</b>						
ความเข้มข้นของโปรตีนระดับต่ำ	20.4	0.8	3.9	21.9	1.0	3.8
ความเข้มข้นของโปรตีนระดับสูง	61.8	1.1	1.8	62.7	1.4	1.8
<b>น้ำยาสำเร็จรูป</b>						
ความเข้มข้นของโปรตีนระดับต่ำ	20.7	0.8	3.9	21.5	1.0	3.8
ความเข้มข้นของโปรตีนระดับสูง	62.0	0.9	1.4	61.3	0.9	1.5





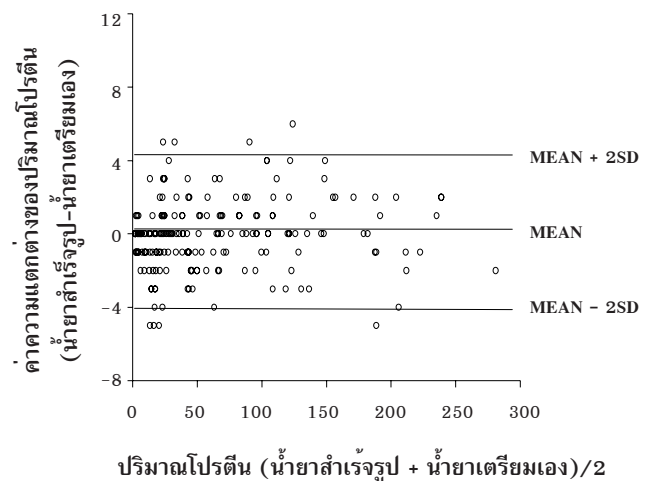
รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของน้ำยาสำเร็จรูป (B) ที่ใช้ตรวจหาโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะและน้ำไขสันหลัง



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของน้ำยาเตรียมเองและน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ตรวจหาโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะและน้ำไขสันหลัง

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยาเตรียมเอง

สารควบคุมคุณภาพ	ค่าที่บริษัทกำหนด	ค่าที่ตรวจวัดได้
	ค่าเฉลี่ยและค่าพิสัย (มก. ต่อ ดล.)	ค่าเฉลี่ยและค่าพิสัย (มก. ต่อ ดล.)
ความเข้มข้นของโปรตีนระดับต่ำ	22 (17-27)	20 (18-22)
ความเข้มข้นของโปรตีนระดับสูง	65 (51-83)	63 (61-65)



รูปที่ 4 แสดงความแตกต่างของการวัดปริมาณโปรตีนของน้ำยาที่เตรียมเองและน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท

### วิจารณ์

จากการประเมินคุณภาพของน้ำยาที่เตรียมเองสำหรับใช้ตรวจวัดระดับโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลังด้วยวิธี benzethonium chloride โดยศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ความเที่ยงตรง (precision) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ค่าต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (lower detection limit) และการเปรียบเทียบผลการตรวจวัดโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะและน้ำไขสันหลังจำนวน 200 ราย พบว่าน้ำยาทั้งสองชนิดให้ผลการตรวจวัดที่มีความสัมพันธ์กันดี ( $r = 0.9990$ ,  $y = 0.996X + 0.356$ ) และผลการตรวจวัดปริมาณโปรตีนของน้ำยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ )

ผลการทดสอบความถูกต้องของน้ำยาที่เตรียมเอง ได้ค่าเฉลี่ยของ percent recovery ของการตรวจวัดโปรตีนในสารละลายมาตรฐานที่มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนสามระดับ คือ 5.0, 20.0 และ 80.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ที่เติมลงในตัวอย่างปัสสาวะที่รู้ค่าโปรตีนแล้วเท่ากับร้อยละ 95.4 ส่วนน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท ได้ค่า percent recovery เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 98.0 ผลการศึกษาความถูกต้องของน้ำยาทั้งสองชนิดได้ค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก และค่า percent recovery ที่ได้ใกล้เคียงกับ 100<sup>11</sup> แสดงว่าน้ำยาทั้งสองชนิดมีความถูกต้องในการตรวจวัดที่ดี ส่วนผลการทดสอบความเที่ยงตรง เมื่อดูจากสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) พบว่าความเที่ยงตรงชนิด within-run และ between-run ของสารควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ (ที่มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนระดับต่ำและสูง) น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัทมีความเที่ยงตรงดีกว่าน้ำยาที่เตรียมเองเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม น้ำยาทั้งสองชนิดถือว่า

มีความเที่ยงตรงที่ดีเพราะให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ไม่เกินร้อยละ 6.0 ตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด<sup>11</sup>

น้ำยาทั้งสองชนิดให้ค่าโปรตีนต่ำสุดที่สามารถวัดได้เท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จากการศึกษาของ Terence, McDowell<sup>14</sup> ได้รายงานค่าต่ำสุดที่วัดได้เท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร การศึกษาในครั้งนี้ได้ค่าที่ต่ำกว่าทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเลือกใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของน้ำยาที่เตรียมเองเพียงพอสำหรับการประเมินผู้ป่วยว่ามีโปรตีนออกมาในปัสสาวะหรือไม่ เนื่องจากเกณฑ์การตัดสินใจของระดับโปรตีนรวมในปัสสาวะในภาวะปกติอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 12 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (ในปัสสาวะที่เก็บครั้งเดียว)<sup>15</sup> สำหรับค่าสูงสุดที่ตรวจวัดได้ที่ยังคงความเป็นเส้นตรงของน้ำยาทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากัน คือ เท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jackson<sup>16</sup> ได้ระบุไว้ว่าวิธีการตรวจวัดโปรตีนโดยอาศัยหลักการวัดความขุ่นมีค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร แสดงว่าช่วงค่าความเป็นเส้นตรงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เหมาะสมดีแล้ว สำหรับความคงตัวของน้ำยาที่เตรียมเองเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลาภายใน 6 เดือน พบว่าลักษณะของน้ำยาไม่เปลี่ยนสี ไม่มีตะกอน และก่อนการตรวจวัดปริมาณโปรตีนมีการควบคุมคุณภาพ (quality control) ของการทดสอบทุกครั้ง พบว่าผลการตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้สารควบคุมคุณภาพยังให้ผลอยู่ในช่วงค่าที่บริษัทกำหนด และปัจจุบันห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกใช้น้ำยาที่เตรียมเองในการตรวจหาปริมาณโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลังในการตรวจวิเคราะห์ประจำวัน

## สรุป

จากผลการประเมินคุณภาพน้ำยาที่เตรียมเองพบว่าให้ผลการตรวจที่ไม่แตกต่างจากน้ำยาสำเร็จรูป คุณสมบัติของน้ำยาที่เตรียมเองพบว่ามีราคาถูก มีค่าความเที่ยงตรงค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้และค่าความเป็นเส้นตรงไม่ต่างจากน้ำยาสำเร็จรูป อีกทั้งเมื่อคำนวณราคาสารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาพบว่าราคาต้นทุนต่ำกว่าน้ำยาสำเร็จรูป 300 เท่า ต้นทุนการตรวจของน้ำยาสำเร็จรูปเท่ากับ 15 บาทต่อการหนึ่งการทดสอบ (ราคาปี พ.ศ. 2546) ส่วนน้ำยาเตรียมเองเท่ากับ 0.05 บาทต่อการหนึ่งการทดสอบ แม้ว่าจะต้องทำการตรวจซ้ำหลายครั้งในกรณีคนไข้โรคไตหรือในตัวอย่างปัสสาวะที่มีค่าโปรตีนสูงกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ก็ยังมีต้นทุนต่ำกว่าน้ำยาสำเร็จรูปมาก ดังนั้น น้ำยา benzethonium chloride ที่เตรียมเอง

นี้จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจหาโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลังเพื่อใช้คัดกรองและประกอบการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยและให้ผลการตรวจวัดที่เชื่อถือได้

## เอกสารอ้างอิง

1. Tietz NW. Fundamentals of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB. Saunders Co; 1999;512-7, 1217-9, 1257-60.
2. Calbreath DF. Clinical chemistry: a fundamental textbook. Philadelphia: WB. Saunders; 1992;85-8.
3. Bergstein JM. A practical approach to proteinuria. *Pediatr Nephrol* 1999;13:697-700.
4. Christensen SE. Protein. In: Anderson SC, Cockayne S, editors. Clinical chemistry: concepts and application. Philadelphia: WB. Saunders; 1993;202-5.
5. Waller KV, Ward KM, Maham JD, Wismatt DK. Current concept in proteinuria. *Clin Chem* 1989;35:755-65.
6. Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP. Clinical chemistry: principles, procedures, correlations. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott; 1996;201-4.
7. Dilena BA, Penberthy LA, Fraser CG. Six methods for determination urinary protein compared. *Clin Chem* 1983;29:553-7.
8. Schosinsky KH, Vagas M, Esquivel AL, Chavarria MA. Simple spectrophotometric determination of urinary albumin by dye binding with use of bromplenol blue. *Clin Chem* 1987;33:223-6.
9. Roche Diagnostics. U/CSF Protein (Package Insert) 1999 Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany.
10. Iwata J, Nishikaze O. New micro-turbidimetric method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 1979;25:1317-19.
11. พรณิ พิเดช. เทคนิคการควบคุมคุณภาพทางเคมีคลินิก (ฉบับปรับปรุงและเพิ่มเติม พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2534;28-40.
12. Peters T jr, Westgart JO. Evaluation of methods. In: Tietz NW, editor. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB. Saunders; 1986;410-23.

13. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two method of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-10.
14. Terence L, McDowell. Benzethonium chloride method for proteins adapted to centrifugal analysis, clinical chemistry 1985;31:864-6.
15. ทศนีย์ เล็บบาค. บรรณาธิการ. การตรวจปัสสาวะและสารน้ำจากร่างกาย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สามเจริญพาณิชย์; 2534.
16. Jackson GB. Cerebrospinal fluid proteins-quantitation. In: Kaplan LA, Press AJ, editors. *Clinical Chemistry* 1989;1037-39.