บทที่ 2

สัตว์ทดลอง สารเคมี อุปกรณ์ และการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ลิงหางยาวเพศเมีย จำนวน 11 ตัว จากโคโลนีของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลิงแต่ละตัวเลี้ยงในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิม ขนาดกว้าง 24นิ้ว สูง 34 นิ้ว และลึก 28 นิ้ว เรือนเลี้ยงลิงกรุด้วยลวดตาข่าย และมุ้งลวด พร้อมทั้งพัดลมดูดอากาศ เพื่อทำให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก และควบคุมปริมาณแสงที่ได้รับแต่ละวัน (ได้รับแสงวันละ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ 06.00-18.00 น.) อาหารเลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปของบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ และเสริมด้วย กล้วย มันเทศ แตงกวา ข้าวโพด ถั่วฝักยาว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00-9.00น. และ 14.00 - 15.00น.

ลิงที่ใช้ในการทดลองเป็นลิงที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ อายุ 5-10 ปี น้ำหนักตัวเฉลี่ย 5.86(4-9.5) กิโลกรัม มีรอบประจำเดือนปกติอย่างน้อย 2 รอบ ก่อนการทดลอง และมีช่วงอยู่ระหว่าง 25-39 วัน

การตรวจนับรอบประจำเดือน

การตรวจนับรอบประจำเดือน ตรวจดูจากถาดรองเศษอาหารของแต่ละกรงในตอนเช้า และเมื่อใกล้ถึงวันที่จะมีประจำเดือนจะทำ vaginal swabbing โดยปกติแล้วถ้าลิงมีประจำเดือน จะพบหยดเลือดอยู่ในถาด ในการนับวันใน 1 รอบประจำเดือนนั้นจะนับวันแรกที่มีประจำเดือนเป็นวันที่ 1 และวันก่อนที่จะพบประจำเดือนครั้งใหม่เป็นวันสุดท้ายของรอบประจำเดือน

ตารางที่ 1 แสดงประวัติโดยสังเขปของลิงหางยาวที่ศึกษา และปริมาณฮอร์โมนไฮโดรคลอไรด์ที่ใช้ในการทดลอง

หมายเลขลิงทดลอง	วัน เดือน ปีเกิด	วันที่มีประจำเดือนครั้งแรก	จำนวนวันของรอบประจำเดือนก่อนการทดลอง	น้ำหนักเมื่อเริ่มศึกษา (ตค.2528)	ปริมาณฮอร์โมนไฮโดรคลอไรด์ที่ฉีด (มจ./กก./วัน)
615	15 กย 2525	3 มค 2529	29-30	6.4	0.1
601	19 กพ 2523	15 เมย 2526	33	3.8	0.1
41 *	ประมาณ พ.ศ.2520	24 กย 2528	25-26	4.7	0.2
61 *	ประมาณ พ.ศ.2520	16 มีค 2528	30	6.2	0.2
64 *	ประมาณ พ.ศ.2522	16 กย 2525	33-34	6.6	0.2
99 *	ประมาณ พ.ศ.2522	13 ตค 2525	38-39	6.6	0.4
616	30 มีค 2526	25 ธค 2529	38-39	4.0	0.4
800 *	ประมาณ พ.ศ.2527	31 มีค 2530	38	4.5	0.4
71 *	ประมาณ พ.ศ.2520	29 ตค 2528	38-39	5.2	0.8
102 *	ประมาณ พ.ศ.2522	18 มิย 2525	37	4.5	0.8
611	26 มิย 2524	28 มิย 2527	36-37	4.9	0.8

เฉลี่ยน้ำหนักตัว 5.86

หมายเหตุ * ลิงที่เกิดในธรรมชาติจากดอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงครามนำมาเลี้ยงก่อนมีประจำเดือนครั้งแรกอายุที่มีประจำเดือนครั้งแรกในธรรมชาติประมาณ 3 ปี (Varavudhi et al., 1989)

อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาเบอร์ 22 G x 1 1/2 " และเบอร์ 26 G x 1/2 "	:	Terumo Corporation, Tokyo, Japan
2. Syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร ชนิดใช้ครั้งเดียวทิ้ง	:	Terumo Corporation, Tokyo, Japan; Yamaguchi Medical instrument co, Ltd, Osaka Japan.
3. Micropipets	:	Pipetman H-81-11912 Gilson France; Eppendorf 3130 Germanney
4. Syringe Dispenser	:	Model 8100 Nichiyo, Co,Ltd,Tokyo Japan
5. Vortex Mixture	:	M-16715, Thermolyne Corporation, Iowa, U.S.A.
6. Dubnoff Incubator-shaker	:	Model 3575-1, Lab-line Instruments Inc., U.S.A.
7. Refrigerater Centrifuge	:	Model PR-J International Equipment Company, Mass- U.S.A.
8. Foam Decanting Rack	:	Diagnostic Products Corporation, U.S.A.
9. Gamma Counter	:	Model 1282 Compugamma LKB Wallac, Finland
10. Polypropylene Test Tubes 12 x 75 mm	:	Elkay Products, Inc., U.S.A.

สารเคมี

1. Total T_4 Double Antibody Commercial Kit : Cat No. KT4D1, Diagnostic Products Corporation, U.S.A.
2. Total T_3 Double Antibody Commercial Kit : Cat. No. KT3D1, Diagnostic Products Corporation, U.S.A.
3. Gamma Coat (125 I) Free T_4 (Two Step) : Cat. No 555A, Baxter Healthcare Corporation U.S.A.
4. GammaDab (125 I) hTSH Radioimmunoassay Kit : Cat. No. CA-581, Baxter Healthcare Corporation, U.S.A.

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเจาะเลือด

ลิงทุกตัวถูกเจาะเลือดประมาณ 7 มิลลิลิตร ทางเส้นเลือดหน้าขา (femoral venipuncture) ในช่วงเวลา 9.00-10.00 น. ก่อนที่จะให้อาหารมื้อเช้า เลือดที่เจาะได้จะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1/2-1 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นจะนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2800 รอบ / นาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนที่เป็นซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 40 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน

2. การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง

ในการศึกษาวิจัยจะแบ่งออกเป็น 3 ระยะดังนี้

2.1 ระยะก่อนให้ยา (pre-treatment) คัดเลือกลิงที่มีรอบประจำเดือนปกติ จากนั้นเจาะเลือดลิงที่เลือกไว้ ในวันที่ 5 (D_5) ของรอบประ

017807

จำเดือนและทุก ๆ 7 วันถัดไปของรอบประจำเดือนนั้น คือวันที่ 12,19,26 และ 33 ตามลำดับ ทำเช่นนี้ติดต่อกันประมาณ 6 รอบประจำเดือน แล้วนำซีรัมที่ได้มาคัดเลือกเอาเฉพาะของรอบประจำเดือน ที่มีระยะเวลาในหนึ่งรอบใกล้เคียงกันจำนวน 2 รอบ มาวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนในซีรัม (ในการคัดเลือกลิงและเก็บซีรัมลิงในระยะก่อนให้ยา ได้กระทำล่วงหน้าโดยคุณ วรรณภา เศรษฐีธรรม นิสิตปริญญาเอก สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

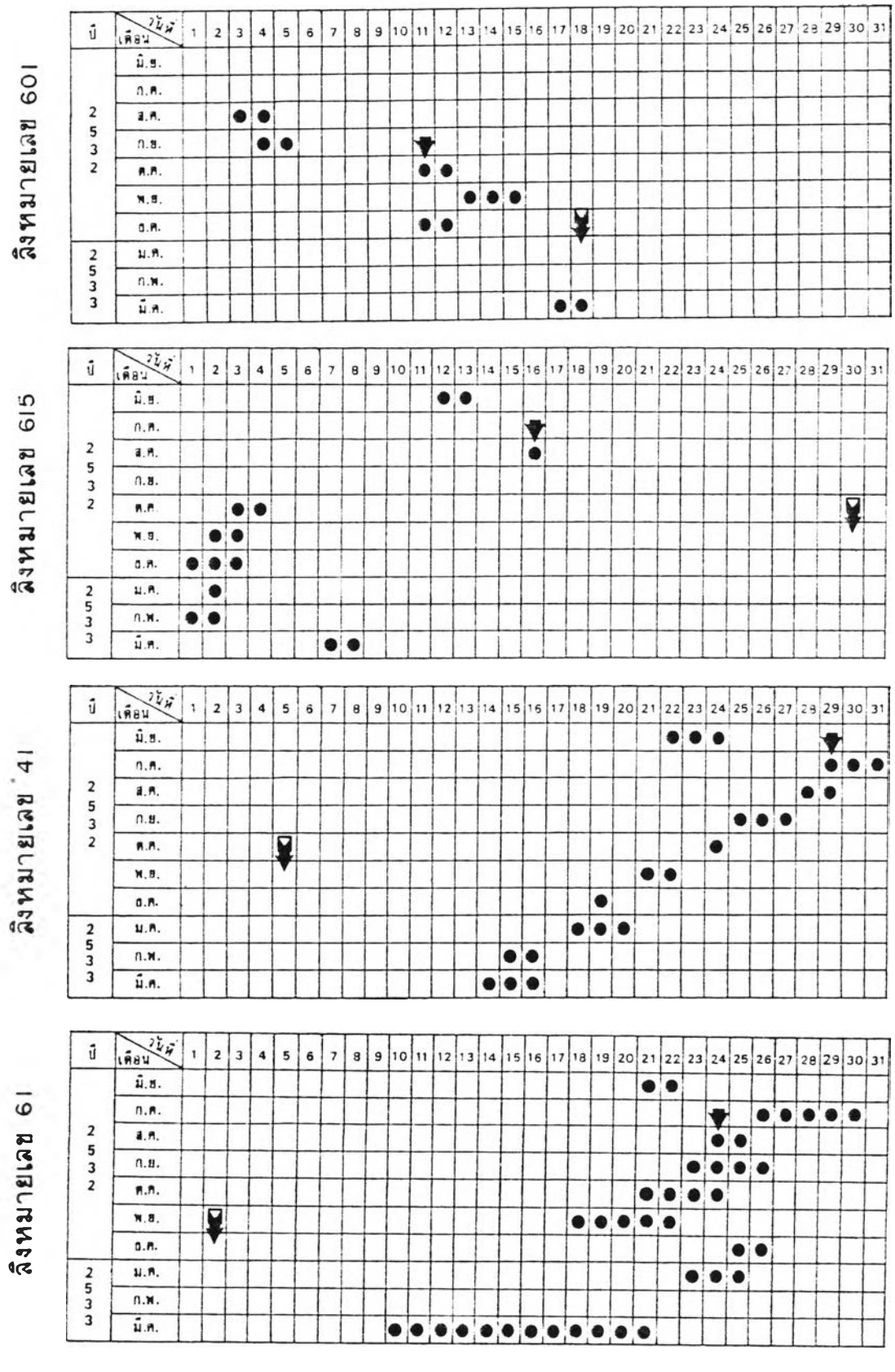
2.2 ระยะการทดลอง(treatment) แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 2,3,3 และ 3 ตัว แล้วฉีดมอร์ฟีนขนาด 0.1,0.2,0.4 และ 0.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณต้นขาลิงเวลา 8.00น ของทุกวันที่ทำการทดลอง หลังจากนั้นจะเจาะเลือดตามปกติเหมือนก่อนการทดลอง คือเจาะในวันที่ 5,12,19,26 และ 33 (D_5, D_{12}, D_{19}, D_{26} และ D_{33}) ของรอบประจำเดือนนั้น แต่ถ้าหากลิงไม่มีประจำเดือนก็จะเจาะเลือดทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลาประมาณ 100 วัน

2.3 ระยะหลังการทดลอง (Post-treatment) ภายหลังจากที่หยุดฉีดมอร์ฟีนจะเจาะเลือดเพื่อมาวิเคราะห์ฮอร์โมนตามปกติเหมือนก่อนการทดลอง ถ้าหากลิงยังมีประจำเดือนอยู่ แต่ถ้าลิงไม่มีประจำเดือนก็จะเจาะเลือดทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลาประมาณ 90 วัน และจะนำลิงทดลองไปทดสอบความสามารถในการเจริญพันธุ์ควบคู่ไปด้วย โดยนำไปผสมพันธุ์กับเพศผู้ที่โตเต็มวัยซึ่งคัดเลือกไว้แล้วในช่วง mid cycle ของรอบประจำเดือนถัดไป (ดังรูปที่ 4) ภายหลังจากหยุดให้ยา

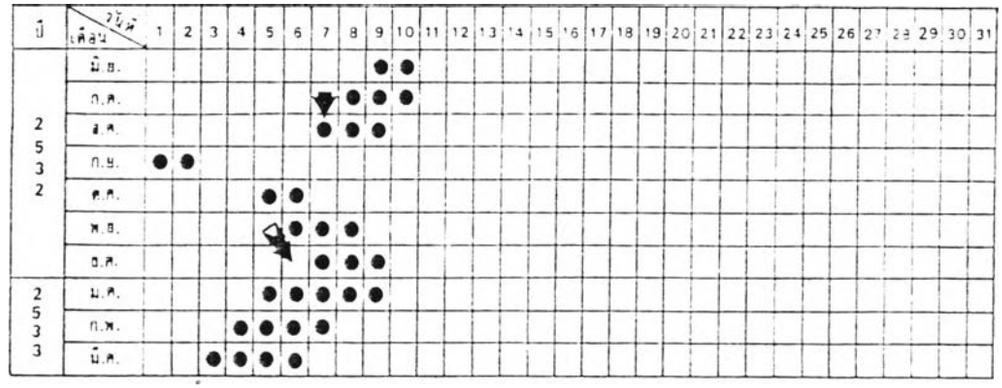
3. การตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (RIA)

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ total T4 และ T3 โดยวิธี RIA ดำเนินการตาม Diagnostic Products Corporation และทำการแก้ไขและปรับปรุงดังนี้

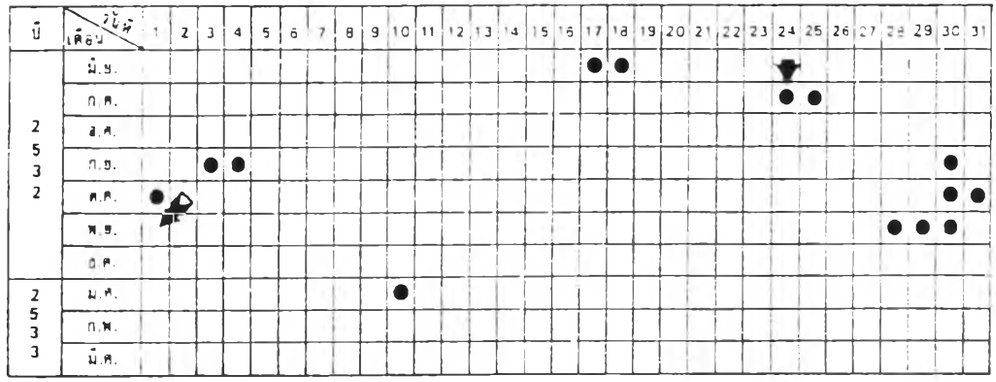
รูปที่ 4 แสดงรอบประจำเดือน , วันที่ให้ฮอร์โมน และ หยุดให้ฮอร์โมน ในลิงทดลองที่ทำการศึกษา ระหว่างเดือนมิถุนายน 2532 ถึงเดือนสิงหาคม 2533



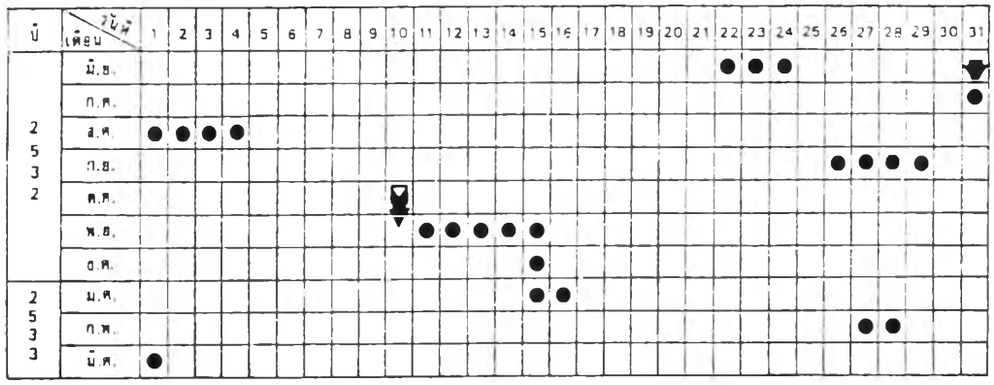
สิงหมายเลข 64



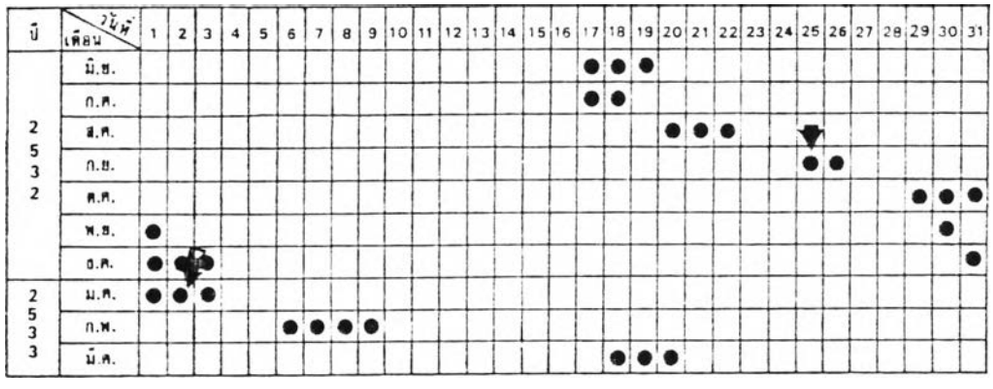
สิงหมายเลข 99



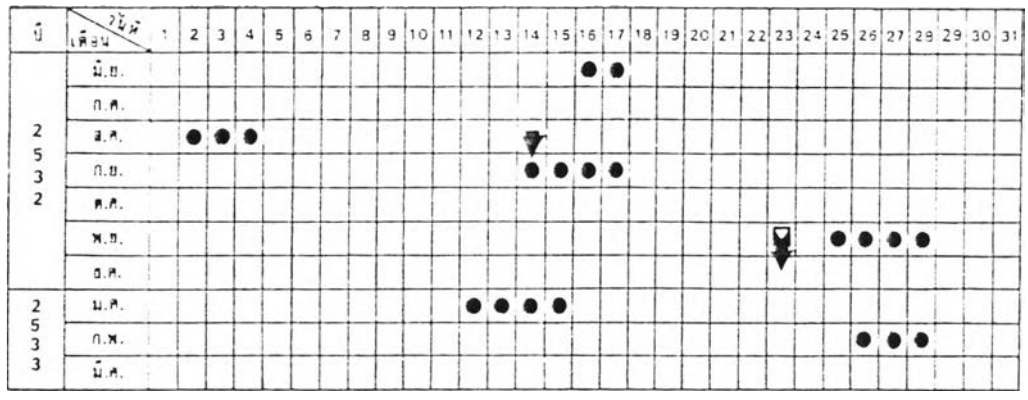
สิงหมายเลข 800



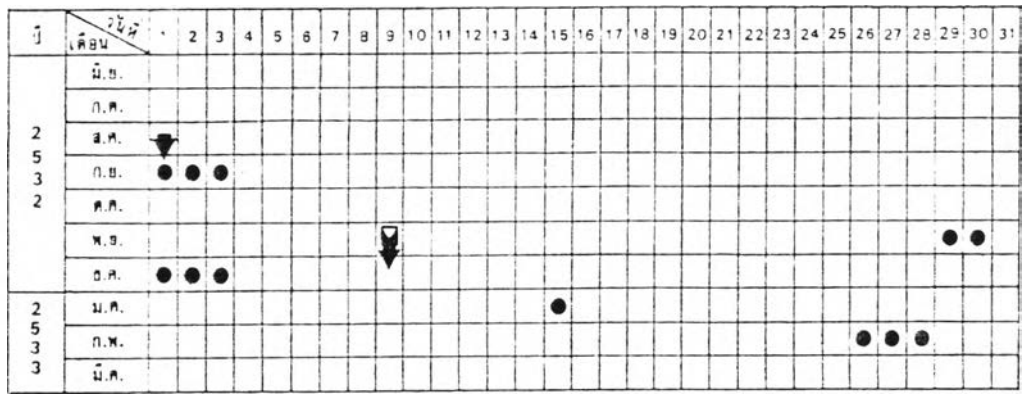
สิงหมายเลข 616



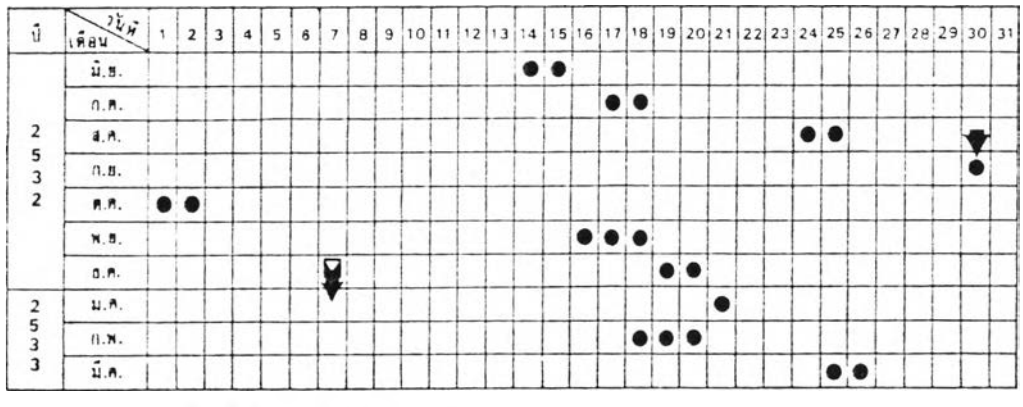
สิงหมายเลข 71



สิงหมายเลข 102



สิงหมายเลข 611



หมายเหตุ

- ● วันที่มีประจำเดือน (menstrual bleeding)
- ▼ วันที่เริ่มให้มอร์ฟิน
- ⏬ วันที่หยุดให้มอร์ฟิน

1. ทำเครื่องหมายข้างหลอดทดลองสำหรับ T (total counts), NSB (non-specific binding), A (maximum binding) และ B ถึง F ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (standard) และสารตัวอย่าง (sample) อย่างละ 2 ชุด ดังตารางข้างล่าง

หมายเลขหลอดทดลอง	สารละลายที่บรรจุ
T1,T2	Total counts (Tracer-buffer)
NSB_1,NSB_2	Non-specific binding blank, 0 ug/dl
A_1,A_2	serum blank ,0 ug/dl
B_1,B_2	T4 serum standard, 1 ug/dl
	หรือ T3 serum standard, 20 ng/dl
C_1,C_2	T4 serum standard, 4 ug/dl
	หรือ T3 serum standard, 50 ng/dl
D_1,D_2	T4 serm standard, 10 ug/dl
	หรือ T3 serum standard, 100 ug/dl
E_1,E_2	T4 serum standard, 16 ug/dl
	หรือ T3 serum standard, 200 ng/dl
F_1,F_2	T4 serum standard, 24 ug/dl
	หรือ T3 serum standard, 600 ug/dl
1,1	serum samples
2,2	
⋮	

2. ปิเปต 10 ไมโครลิตรของสารละลายแต่ละชนิด ลงในหลอดทดลอง ยกเว้นหลอด total counts สำหรับ T_4 และ 50 ไมโครลิตรสำหรับ T_3

3. เติม [^{125}I]T_4 หรือ[^{125}I]T_3 (tracer-

buffer reagents 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่า test tube rack เบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

4. เติม T4 หรือ T3 antiserum 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ยกเว้นหลอด NSB และ total counts นำไปปั่นให้สารละลายผสมกันด้วย vortex mixer และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาทีสำหรับ T4 และ 60 นาทีสำหรับ T3

5. เติม cold precipitating solution 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ปั่นด้วย vortex mixer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกครั้งนาน 5 นาทีสำหรับ T4

6. นำไปปั่นที่ 3000xg นาน 15 นาที เทสารละลายทิ้ง นำตะกอนที่เหลือไปนับรังสีด้วย gamma counter นานหลอดละ 1 นาที

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ TSH โดยวิธี RIA

ดำเนินการตามวิธีการของ Baxter Healthcare Corporation ดังนี้

1. ทำเครื่องหมายข้างหลอดทดลอง สำหรับ T (total counts), NSB (non-specific binding), A (maximum binding) และ B ถึง F ซึ่งเป็นสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง อย่างละ 2 ชุดดังตาราง

หมายเลขหลอดทดลอง	สารละลายที่บรรจุ
T1,T2	Total counts (tracer-buffer)
NSB1,NSB2	Non-specific binding blank, 0 uIU/ml
A1,A2	hTSH serum blank, 0 uIU/ml
B1,B2	hTSH serum standard, 2 uIU/ml
C1,C2	hTSH serum standard, 5 uIU/ml

หมายเลขหลอดทดลอง	สารละลายที่บรรจุ
D1,D2	hTSH serum standard, 10 uIU/ml
E1,E2	hTSH serum standard, 20 uIU/ml
F1,F2	hTSH serum standard, 50 uIU/ml
1,1	serum samples
2,2	
⋮	

2. ปิเปต 200 ไมโครลิตร ของสารละลายแต่ละชนิด ลงในทดลอง ยกเว้นหลอด total counts (T1,T2)

3. เติม hTSH non-specific binding reagent 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด NSB

4. เติม rabbit anti-human TSH serum 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ยกเว้นหลอด total counts และหลอด NSB เขย่า test tube rack เบา ๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 1 ชั่วโมง

5. เติม [^{125}I] human TSH tracer 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่า test tube rack เบา ๆ นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 2 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียสข้ามคืน (18-20 ชั่วโมง)

6. เติม precipitating antiserum reagent 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด (ยกเว้นหลอด total counts) ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสใน water bath นาน 5 นาที

7. นำไปปั่นที่ 1000 xg นาน 15 นาที เทสารละลายทิ้งไป นำตะกอนที่เหลือไปวัดปริมาณรังสีด้วย gamma counter นานหลอดละ 1 นาที

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ FT_4 โดยวิธี RIA

ทำตามวิธีการของ Baxter Healthcare Corporation ดังนี้

1. ทำเครื่องหมายข้างหลอดทดลอง สำหรับ T (total counts), A (maximum binding) และ B ถึง F ซึ่งเป็นสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง อย่างละ 2 ชุดดังตาราง

หมายเลขหลอดทดลอง	สารละลายที่บรรจุ
T1,T2	Total counts (tracer-buffer)
A1,A2	T4 serum balnk, 0 ug/dl
B1,B2	T4 serum standard, CA -281*
C1,C2	T4 serum standard, CA-282*
D1,D2	T4 serum standard, CA-283*
E1,E2	T4 serum standard, CA-284*
F1,F2	T4 serum standard, CA-285*
1,1	serum samples
2,2	
⋮	

หมายเหตุ * ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน FT_4 (CA-281-CA-285) มีเขียนไว้ที่ข้างขวด ซึ่งมีค่าแตกต่างกันในสารเคมีแต่ละชุดที่ได้รับ

2. ปิเปต 50 ไมโครลิตรของสารละลายแต่ละชนิด ลงในหลอดทดลอง ยกเว้นหลอด total counts (T1,T2)

3. เติม incubation buffer หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร ยกเว้นหลอด total counts เขย่า test tube rack ให้สารละลายผสมกัน

นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสใน water bath นาน 20 นาทีจากนั้น เทสารละลายทิ้งทุกหลอด ยกเว้นหลอด tatal counts

4. เติม incubation buffer 1.0 มิลลิตร อีกครั้ง (ยกเว้นหลอด tatal counts) เพื่อชะล้าง TBG ที่จับกับ T_4 ที่เหลืออยู่ เทสารละลายทิ้งไป

5. เติม tracer buffer reagent 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่า test tube rack เบา ๆ แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เทสารละลายทิ้ง

6. นำไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วย gamma counter นานหลอดละ 1 นาที

3.4 การคำนวณหาปริมาณฮอร์โมน

1. นำค่า cpm ของฮอร์โมนมาตรฐาน มาคำนวณเป็นค่า % B/Bo

$$\% \ B/Bo = \frac{CPM_x - CPM_{NSB} \times 100}{CPM_{Bo} - CPM_{NSB}}$$

CPM_x = CPM ของฮอร์โมนมาตรฐาน หรือ ฮอร์โมนตัวอย่าง

CPM_{NSB} = ค่าเฉลี่ย CPM ของหลอด NSB

CPM_{Bo} = ค่าเฉลี่ย CPM ของหลอดอ้างอิง (blank tube)

2. เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของฮอร์โมนมาตรฐานกับ %B/BO

3. นำค่า % B/Bo ของฮอร์โมนตัวอย่าง มาเทียบหาค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐาน

<u>หมายเหตุ</u> ในการคำนวณหาปริมาณฮอร์โมน เครื่องตรวจวัดรังสี (gamma counter) ที่ใช้จะมีโปรแกรมสร้างกราฟมาตรฐานและอ่านค่าปริมาณฮอร์โมนของสารตัวอย่างให้ได้โดยไม่ต้องมาเขียนกราฟและคำนวณหาค่าปริมาณฮอร์โมนของสารตัวอย่างเอง

การประเมินผลวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน

ได้ดำเนินการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) ความไว (sensitivity) และ parallelism check ดังนี้

1. ความจำเพาะ (specificity)

เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ศึกษา ว่าสามารถเกิดปฏิกริยากับสารอื่นใดที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับฮอร์โมน หรือกับสารที่มีปริมาณมาก ๆ ในสารตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษาได้มากน้อยเพียงใด โดยทำ cross reactivity (ความสามารถในการเกิดปฏิกริยากับสารอื่น) ระหว่างแอนติบอดีที่ใช้กับสารที่นำมาทดสอบแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว และคำนวณหาเปอร์เซนต์ cross reaction ที่ระดับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว 50 เปอร์เซนต์ ดังสมการ

$$\% \text{ cross reaction} = b/a \times 100$$

a = ปริมาณความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด ที่ทดสอบจากกราฟมาตรฐานของสารนั้น ที่ระดับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์

b = ปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน (ในสารตัวอย่าง) ที่ต้องการศึกษาจากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนนั้นที่ระดับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว เท่ากับ 50 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 2 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ TSH ที่ศึกษาและสารอื่น ๆ ที่นำมาตรวจสอบ

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reactivity
TSH	100
LH	1.0
FSH	<0.1
hCG	<0.1

หมายเหตุ ทดสอบโดยบริษัท Baxter Healthcare Corporation

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี T3 ที่ศึกษาและสารอื่น ๆ ที่นำมาตรวจสอบ

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reactivity
Triiodo-L-thyronine(T3)	100
L-T4	0.086
D-T4	0.92
Tetraiodothyroacetic acid	0.55
Monoiodotyrosine	0.02
3,5-Diiodo-L-tyrosine	0.03
5,5' - Diphenylhydantoin	0.02
Phenylbutazone	0.01
Methimazole	0.06
6-n-Propyl-2-thiouracil	0.002

หมายเหตุ ทำการทดสอบโดยบริษัท Diagnostic Products Corporation

ตารางที่ 4 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ T4 ที่ศึกษาและสารอื่น ๆ ที่น่ามาตรวจสอบ

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reactivity
L-T4	100
D-T4	100
Tetraiodothyroacetic acid	7.1
Triiodo-L-thyronine	4.0
Triiodo-D-thyronie	3.7
Diiodo-L-thyrosine	0.058
Monoiodothyrosine	0.36
Methimazone	0.42
5,5-diphenylhydantoin	0.051
Phenylbutazone	0.059
6-n-Propyl-2-thiouracil	0.42
Triiodothyroacetic acid	0.62

หมายเหตุ ทำการทดสอบโดยบริษัท Diagnostic Products Corporation

ตารางที่ 5 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ FT4 ที่ศึกษาและสารอื่น ๆ ที่นำมาตรวจสอบ

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reactivity
L-T4	100
D-T4	100
L-T3	0.9
D-T3	2.1
D,L-Diiodothyronine	<0.01
L-Diiodothyronine	<0.01
Phenytoin	<0.01
Phenylbutazone	<0.01
Propylthiouracil	<0.10
D,L-Tyrosine	<0.01

หมายเหตุ ทำการทดสอบโดยบริษัท Baxter Healthcare Corporation

2. ความแม่นยำ (precision)

เป็นการตรวจสอบความสามารถ ในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่างชนิดหนึ่ง ๆ ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งแล้วค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน ค่าความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน (intra-assay) และค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง (interassay) โดยการนำสารควบคุมคุณภาพ (pooled serum) 3 ระดับคือ ค่าสูง ค่ากลางและค่าต่ำ มาตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนในสารตัวอย่าง ทำอย่างน้อย 10 ซ้ำเพื่อหาค่าความแม่นยำในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน และทำ 2 ซ้ำในแต่ละครั้งที่ทำการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน เพื่อนำมาคำนวณหาค่าความแม่นยำในการตรวจวัดแต่ละครั้ง

การแสดงค่าความแม่นยำ จะแสดงเป็นเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficinetof variation หรือ % CV) ดังนี้

ตารางที่ 6 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ TSH ในการตรวจวัดครั้งเดียวกันและการตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	การตรวจวัดครั้งเดียวกัน (n=10) X ± S.D. (uIU/ml)	% CV	การตรวจวัดแต่ละครั้ง (n=9) X ± S.D. (uIU/ml)	% CV
ระดับสูง	18.27±1.04	5.69	17.37±0.98	5.64
ระดับปกติ	2.37±0.40	16.87	2.54±0.37	14.56
ระดับต่ำ	3.14±0.49	15.60	2.74±0.43	15.69

ตารางที่ 7 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ T_4 ในการตรวจวัดครั้งเดียวกันและการตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	การตรวจวัดครั้งเดียวกัน (n=10) X ± S.D. (ug/dl)	% CV	การตรวจวัดแต่ละครั้ง (n=10) X ± S.D. (ug/dl)	% CV
ระดับสูง	23.69±2.08	8.78	20.16±1.65	8.18
ระดับปกติ	11.44±0.44	3.85	10.78±0.77	7.14
ระดับต่ำ	3.98±0.29	7.28	4.19±0.47	11.21

ตารางที่ 8 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ T_3 ในการตรวจวัดครั้งเดียวกันและการตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	การตรวจวัดครั้งเดียวกัน (n=10) X ± S.D. (ng/dl)	% CV	การตรวจวัดแต่ละครั้ง (n=9) X ± S.D. (ng/dl)	% CV
ระดับสูง	451.29±17.44	3.86	436.27±40.03	9.17
ระดับปกติ	137.01±15.26	11.13	139.12±11.11	7.98
ระดับต่ำ	89.84±4.32	4.86	86.12±10.35	12.01

ตารางที่ 9 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดปริมาณ FT_4 ในการตรวจวัดครั้งเดียวกันและการตรวจวัดแต่ละครั้ง

สารควบคุมคุณภาพ	การตรวจวัดครั้งเดียวกัน (n=10) X ± S.D. (ng/dl)	% CV	การตรวจวัดแต่ละครั้ง (n=7) X ± S.D. (ng/dl)	% CV
ระดับสูง	4.14±0.45	10.86	4.32±0.50	11.57
ระดับปกติ	1.58±0.12	7.59	1.60±0.14	8.75
ระดับต่ำ	0.71±0.06	8.45	0.70±0.055	7.14

3. ความไวของการตรวจวัด (sensitivity)

เป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน จากสารตัวอย่าง ได้ค่าที่น้อยที่สุดและแยกจากค่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ โดยกำหนดจากค่าปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน ที่ระดับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว 95 เปอร์เซนต์จากกราฟมาตราฐาน ที่ตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนความเข้มข้นศูนย์ (blank) ซ้ำกันอย่างน้อย 10 ครั้ง

ตารางที่ 10 แสดงความไวของการตรวจวัด TSH , T_4, T_3 และ FT_4

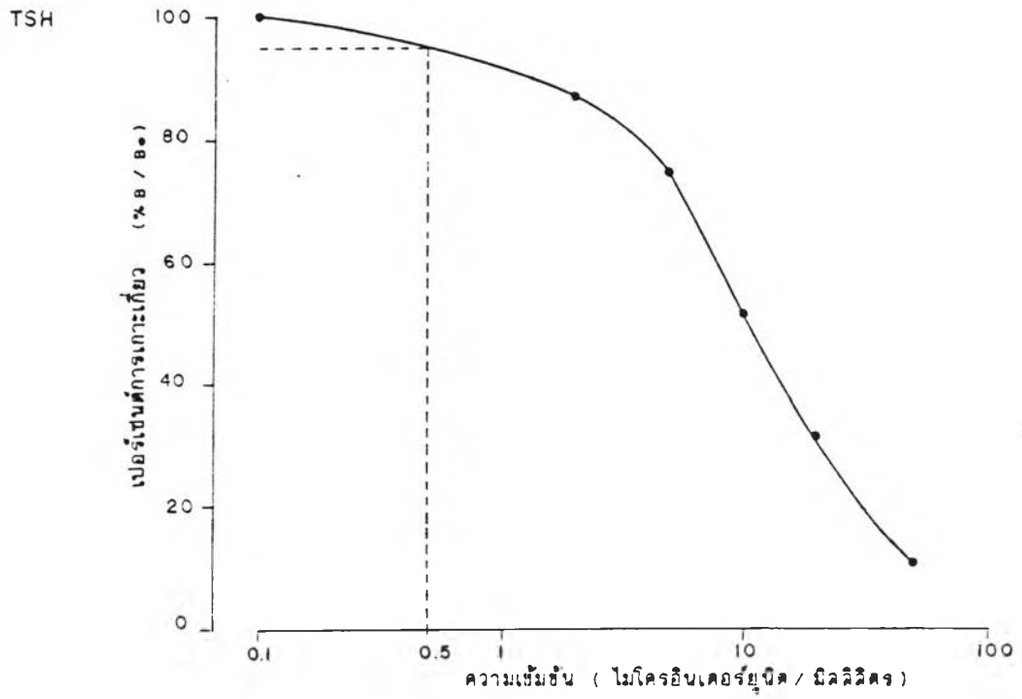
ฮอร์โมน	ความไวของการตรวจวัด
TSH	0.48 uIU/ml
T_4	0.5 ug/dl
T_3	6 ng/dl
FT_4	0.09 ng/dl

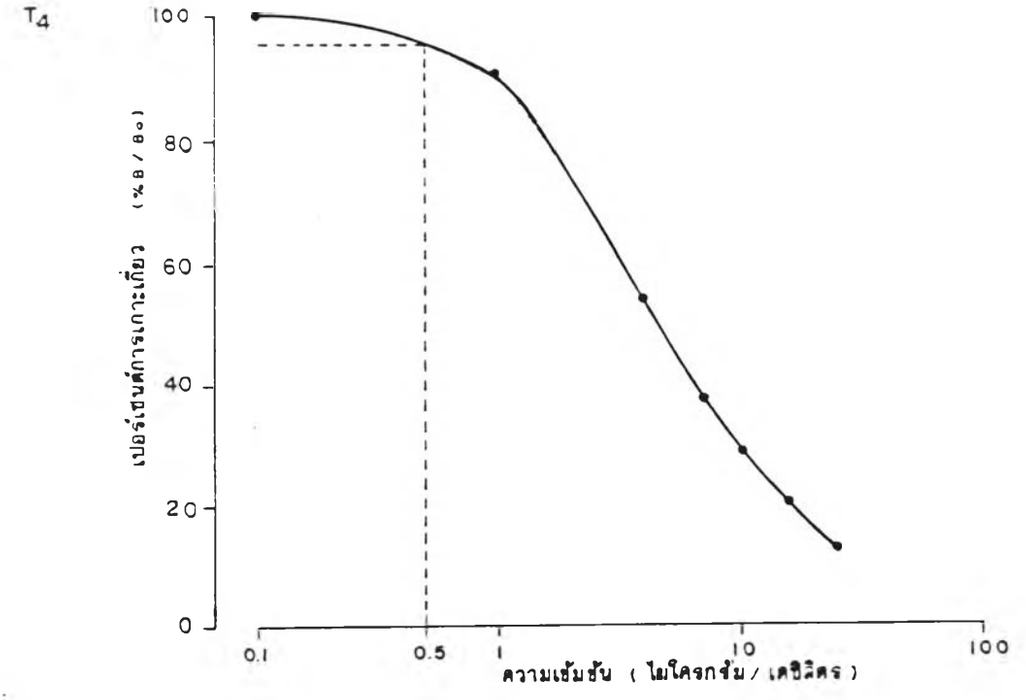
4. ความถูกต้อง (accuracy)

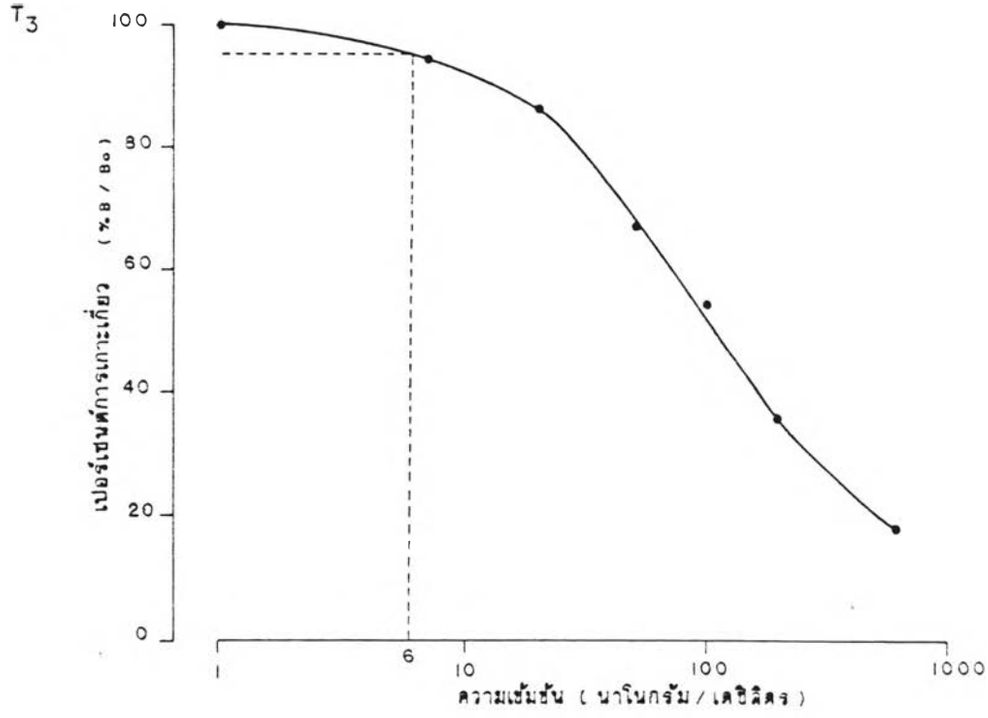
เป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน จากสารตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมน เติมลงในสารตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้นฮอร์โมนแน่นอนแล้ว ไปผ่านการตรวจวัดพร้อมกับสารตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นที่ได้กับปริมาณความเข้มข้นจริงที่ทราบ คำนวณค่าความถูกต้องจากสูตร ดังนี้

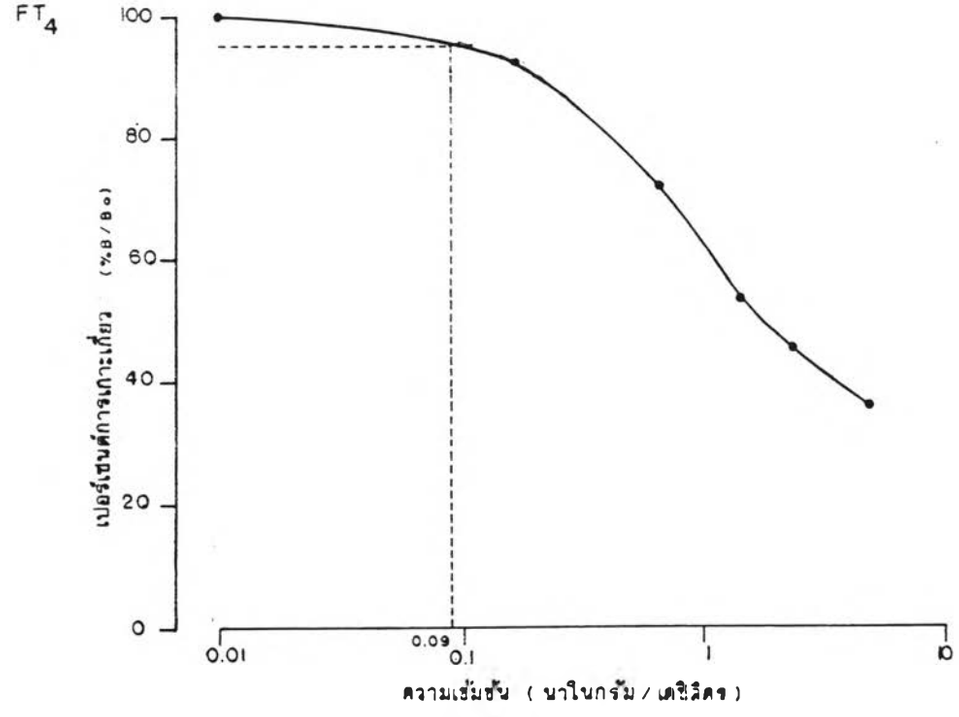
$$\text{เปอร์เซนต์ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่วัดได้} \times 100}{\text{ค่าฮอร์โมนที่ใส่ลงไปจริง}}$$

รูปที่ 5 แสดงความไวในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน TSH , T_4 , T_3 และ FT_4 ในซีรัมของลิงทดลอง






T_3
100
80
60
40
20
0
เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว (%B/Bo)
1
6
10
100
1000
ความเข้มข้น (นาโนกรัม / เดซิลิตร)


FT_4
100
80
60
40
20
0
เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว (%B/Bo)
0.01
0.09
0.1
1
10
ความเข้มข้น (นาโนกรัม / เดซิลิตร)

ตารางที่ 11 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ TSH

ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารมาตรฐาน (uIU/ml)	ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารตัวอย่าง (uIU/ml)	ค่าจริง (uIU/ml)	ค่าจากการตรวจวัด (uIU/ml)	% ความถูกต้อง
0.00	2.55	2.55	2.69	105.49
5.00	2.55	7.55	7.84	103.89
10.00	2.55	12.55	12.60	100.39
20.00	2.55	22.55	20.26	89.84

ตารางที่ 12 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ T_4

ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารมาตรฐาน (ug/dl)	ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารตัวอย่าง (ug/dl)	ค่าจริง (ug/dl)	ค่าจากการตรวจวัด (ug/dl)	% ความถูกต้อง
4.54	10.31	14.85	15.17	102.15
10.31	10.31	20.62	20.80	100.88
19.11	10.31	29.42	26.62	90.48

ตารางที่ 13 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ T_3

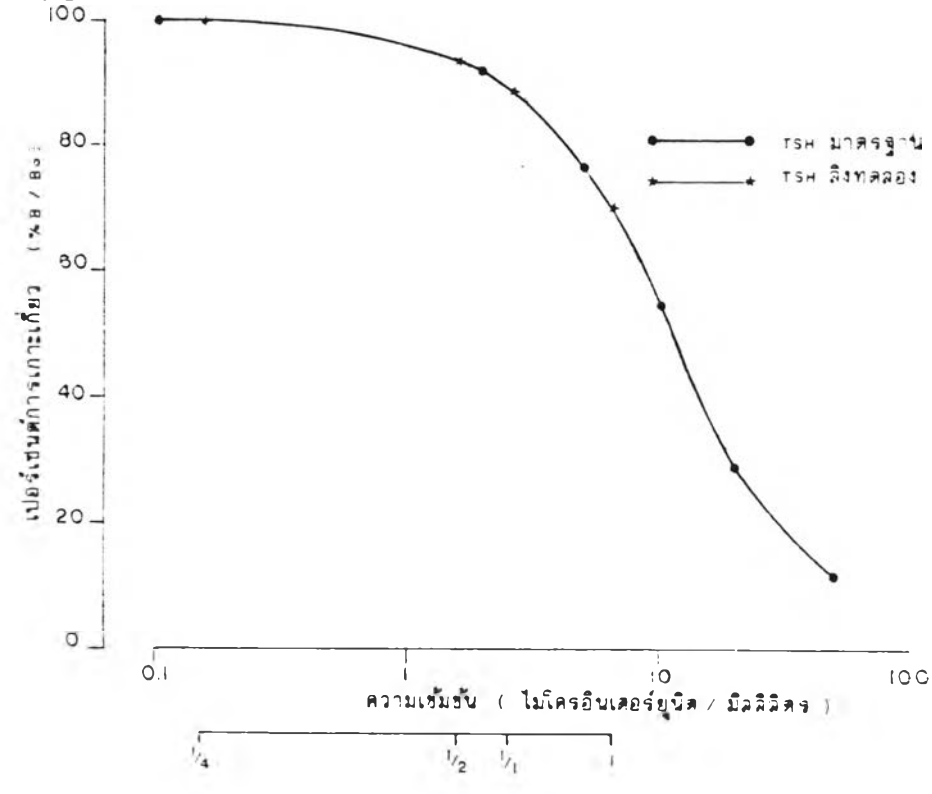
ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารมาตราฐาน (ng/dl)	ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารมาตรฐาน (ng/dl)	ค่าจริง (ng/dl)	ค่าจากการตรวจวัด (ng/dl)	% ความถูกต้อง
0.00	76.92	76.92	83.16	108.00
100.00	76.92	176.92	188.63	106.62
300.00	76.92	376.92	342.17	90.78

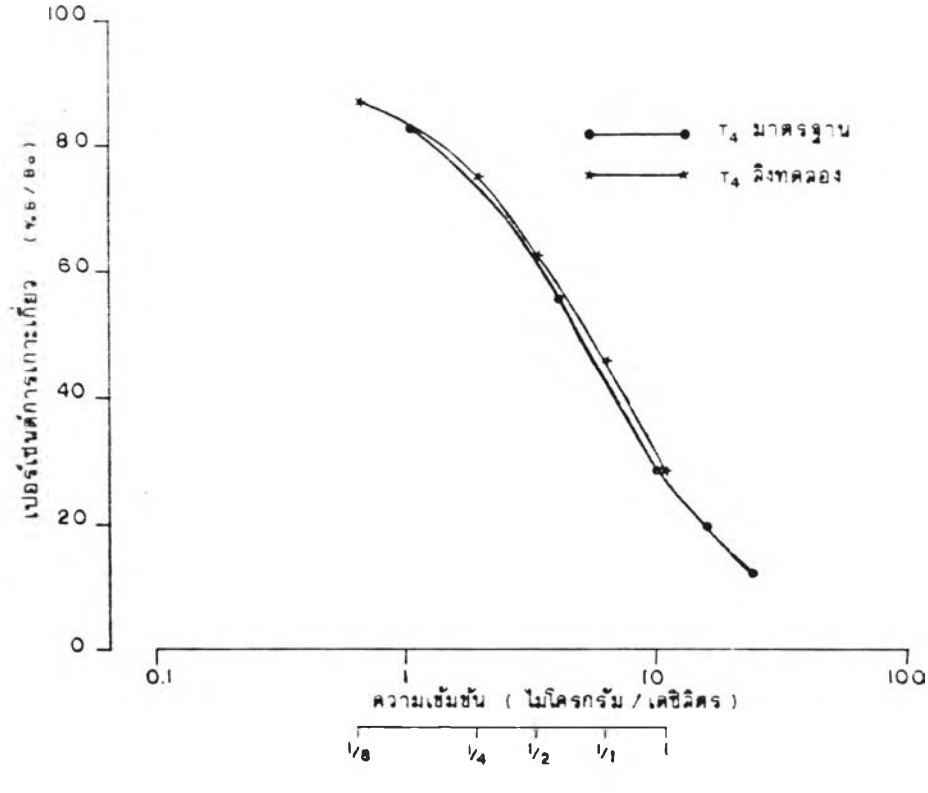
5. Parallelism check

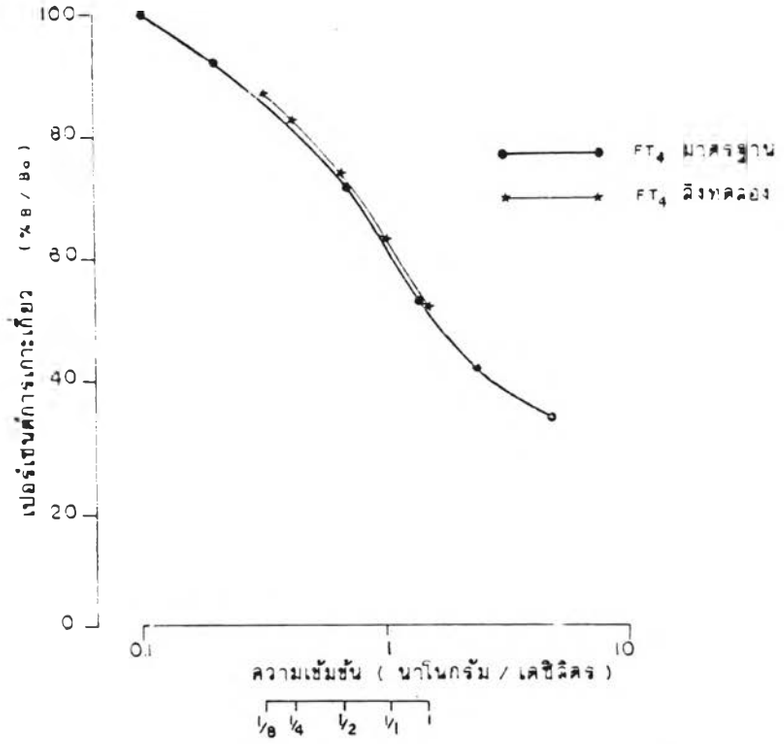
ในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมน โดยวิธี RIA เป็นการเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสารมาตรฐานกับสารตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้สารมาตรฐานที่ใช้เป็นฮีร์มคน และสารตัวอย่างที่ใช้เป็นฮีร์มลิงหางยาว ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบ immunochemical reaction ระหว่างสารมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้หรือไม่ แล้วเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวกับความเข้มข้นของสารที่ระดับต่าง ๆ

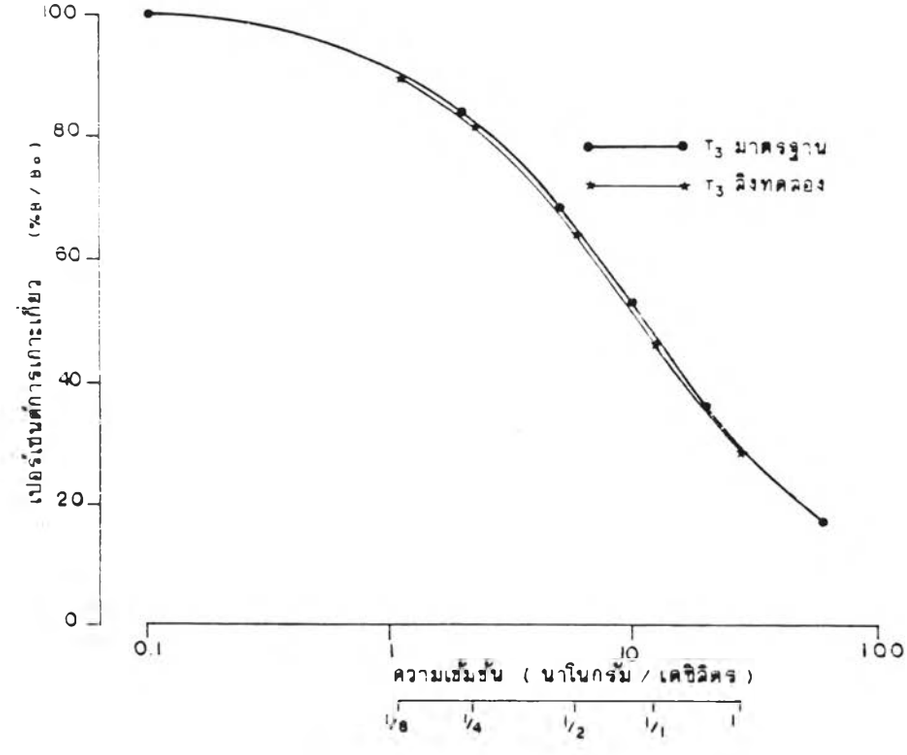
ถ้าหากสารมาตรฐานและสารตัวอย่างมี immunochemical reaction เหมือนกัน กราฟที่ได้จะขนานกัน (parallel) หรือซ้อนทับกัน

รูปที่ 6 เปรียบเทียบ immunochemical identity ระหว่างสารละลายมาตรฐาน TSH, T_4, T_3 และ FT_4 กับฮอร์โมน TSH, T_4, T_3 และ FT_4 ตามลำดับ ในซีรัมของสิ่งที่ทำการทดลอง






100
80
60
40
20
0
เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว (%B / Bo)
FT4 มาตรฐาน
FT4 สิ่งทดลอง
0.1
1
10
ความเข้มข้น (นาโนกรัม / เดซิลิตร)
1/8 1/4 1/2 1/1


100
80
60
40
20
0
เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว (%B / Bo)
T3 มาตรฐาน
T3 สิ่งทดลอง
0.1
1
10
100
ความเข้มข้น (นาโนกรัม / เดซิลิตร)
1/8 1/4 1/2 1/1 1