

Comparative Analysis of Serum Ceruloplasmin Levels in Wilson Disease by Conventional Enzymatic Assay and Immunologic Method

Rungtip Soi-ampornkul, Ph.D.*, Sarawut Junnu, B.Sc.*, Wattanachai Chotinaiwattarakul, M.D.**,
Uchane Wongmanee, B.Sc.*, Bhoon Suktitipat, M.D.*, Neelobol Neungton, M.D.*

*Department of Biochemistry, **Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.

ABSTRACT

Objective: Serum ceruloplasmin, which has markedly decreased in 95% of patients with Wilson disease, is one of the most useful markers in the diagnosis of this genetic disease. The disease is caused by an impairment of the excretion of hepatic copper, resulting in toxic accumulation of the metal in the brain, liver and other organs. Definite diagnosis leads to the need of continual, lifelong and effective treatment. Therefore, the accuracy of the measurement of this serum protein is clinically needed. Our study is aimed to compare the reliability of the two methods used in measuring serum ceruloplasmin: the conventional enzymatic assay and the recent immunologic method by using kit reagents.

Methods: Serum ceruloplasmin levels were performed by the conventional enzymatic assay as reported by Ravin in 1961, and compared to the immunologic method using kit reagents, Dade Behring Inc., Newark, USA. Seven patients with clinically proven Wilson disease and twenty-two controls were recruited for the study.

Results: The mean $\pm$ SD levels of serum ceruloplasmin from all patients and controls as measured by the enzymatic assay were 1.58 ± 2.28 mg/dl and 28.94 ± 9.60 mg/dl, respectively. The serum levels from those patients measured by the kit assay were less than 8 mg/dl while the mean $\pm$ SD of controls were 25.91 ± 7.71 mg/dl. All serum ceruloplasmin levels after measurement by both assays showed a strong correlation coefficient ($r = 0.8713$; p -value < 0.01), with a significant decrease in all patients with Wilson disease when compared to controls.

Conclusion: Our study supported the high correlation between the conventional enzymatic assay and the recent immunologic method in measuring serum ceruloplasmin. Although the analysis kit is expensive, it is more advantageous for routine laboratory service because of its simpler, automated test with a well-accepted quality control.

Keywords: Ceruloplasmin; Wilson disease

Siriraj Med J 2006;58: 600-605

E-journal: [http:// www.sirirajmedj.com](http://www.sirirajmedj.com)

ซีโรพลาสมีน (ceruloplasmin) เป็นกลัยโคโปรตีนที่สังเคราะห์จากตับ น้ำหนักโมเลกุล 132,000 D มีคาร์โบไฮเดรต 7% แต่ละอนุภาคมียวทูตอยู่ 6-8 อะตอม โดยที่ทวทูตแดงเมื่อรวมกับ apoceruloplasmin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มีสีแล้วจะได้เป็นซีโรพลาสมีนที่มีสีน้ำเงิน 90% ของทวทูตแดงในซีรัมจะจับอยู่กับซีโรพลาสมีน แต่ไม่ใช่เป็นการขนส่งทวทูตแดงไปให้เนื้อเยื่อต่าง ๆ ใช้เนื่องจากการจับแน่นเพื่อป้องกันไม่ให้มีทวทูตแดงเสรีมากเกินไปจนเกิดการคั่งและเป็นพิษต่อเซลล์ต่าง ๆ ได้¹⁻⁷

ซีโรพลาสมีนเป็นโปรตีนที่เป็น acute phase reactant ชนิดหนึ่ง ซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นขณะเมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้น ทั้งนี้ในภาวะดังกล่าวเซลล์เม็ดเลือดขาว และ macrophage จะปล่อยอนุมูลเสรี (free radicals) ออกมามากมาย เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เกิดขึ้น

ขณะเดียวกันอนุมูลเสรีที่มากเกินไป อาจทำอันตรายต่อเซลล์ปกติได้ เช่น การเกิด lipid peroxidation ที่เซลล์เมมเบรน ซึ่งซีโรพลาสมีนจะช่วยลดฤทธิ์ของอนุมูลเหล่านี้ได้เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับเซลล์ปกติ ขณะที่มีการอักเสบดังกล่าว หน้าที่อีกประการหนึ่งของซีโรพลาสมีนในร่างกาย คือ ช่วยในการดูดซึมและขนส่งเหล็กในทางเดินอาหาร โดยการออกฤทธิ์เป็น oxidase ที่สำคัญคือฤทธิ์ ferroxidase ซึ่งจะเร่งการเปลี่ยน Fe^{2+} เป็น Fe^{3+} ที่บริเวณผิวเซลล์ ก่อนที่เหล็กจะเข้าร่วมกับ apotransferrin เพื่อถูกขนส่งต่อไปในรูป transferrin¹⁻⁴ พลาสมาซีโรพลาสมีนในคนปกติ มีค่า 20-50 มก./ดล. แต่ในเด็กเกิดใหม่ จะมีค่าต่ำราว 1 ใน 3 ของผู้ใหญ่ จากนั้นระดับจะเพิ่มขึ้นจนเท่ากัน ภายหลังอายุ 1 ปี ไปแล้ว ในบางภาวะ จะมีค่าสูงขึ้นได้ เช่น ขณะตั้งครรภ์, มีการอักเสบ, ดิเคซัองต่าง ๆ หรือ โรคกระเริงบางชนิด

ปริมาณซีโรพลาสมีนที่ลดต่ำลงมีความสำคัญมากในการช่วย

Correspondence to: Rungtip Soi-ampornkul
E-mail: sirsm@mahidol.ac.th

วินิจฉัยโรค Wilson disease (Hepatolenticular degeneration)¹⁻⁷ ซึ่งเป็นโรคกรรมพันธุ์ ที่แม้จะพบได้ยาก มีความชุกของโรคประมาณ 1:30,000¹ แต่ก็ยังพบได้ในคนไทยทั่วไป กลไกการเกิดโรคเชื่อว่าเกิดจากความผิดปกติของเซลล์ตับ ที่ไม่สามารถขับทองแดงส่วนเกินออกไปในทางเดินน้ำดีได้ และมักพบร่วมกับการที่มี apoceruloplasmin ต่ำ (พบได้ 95%) หรือไม่ต่ำแต่ผิดปกติ (พบได้ 5%) จึงไม่สามารถขับทองแดงไว้ได้ ทำให้มีทองแดงเสริมมากเกินจนเป็นพิษจากการที่ไปสะสมและทำลายอวัยวะต่าง ๆ เช่น ระบบประสาท โดยเฉพาะการทำลายเซลล์สมองส่วน lenticular nucleus ของ basal ganglia และที่เซลล์ตับจนเสื่อมหน้าที่ นอกจากนั้นยังพบลักษณะเฉพาะของผู้ป่วยโรคนี้ คือ Kayser-Fleischer ring (K-F ring) เป็นวงแหวนสีน้ำตาลปนเขียวรอบตาเกิดจากการสะสมของทองแดงที่บริเวณ Descemet's membrane ของกระจกตา (cornea) ในผู้ป่วยโรควิลสันที่มีอาการทางระบบประสาทมักจะตรวจพบวงแหวนนี้เกือบทุกราย อาการของผู้ป่วยโรคนี้จะรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงตายได้ ถ้าไม่ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้องและการรักษาอย่างเหมาะสม ปัจจุบันมีผลงานวิจัยชัดเจนแล้วว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรควิลสันนี้อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3 ของยีนส์ ATP7B ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่สนับสนุนโรควิลสันคือ 1) มีระดับพลาสมาเซรูโลพลาสมีนต่ำซึ่งโดยทั่วไปให้ค่าต่ำกว่า 20 มก./ดล.¹⁻⁵ สำหรับในคนไทยมีรายงานไว้ที่ต่ำกว่า 13 มก./ดล. แต่ส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียง 0⁶⁻⁷ รวมแล้วพบค่าต่ำประมาณ 95% ของผู้ป่วย และอีก 5% มีระดับปกติ 2) ปริมาณของทองแดงที่เนื้อตับมากกว่า 250 ไมโครกรัม/กรัมทึชซูแห้ง และ 3) ปริมาณของทองแดงที่ขับออกทางปัสสาวะมากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อวัน สำหรับการทดสอบที่แน่นอนที่สุดของโรควิลสัน คือ การฉีดสารกัมมันตรังสี⁶⁴Cu หรือ⁶⁷Cu เข้าทางหลอดเลือด ภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากนั้นในคนปกติจะต้องขับทองแดงที่ฉีดเข้าไปทั้งหมดออกทางน้ำดีเพื่อทิ้งไปกับอุจจาระ แต่ถ้ายังมีเหลือค้างจนตรวจพบได้ในเลือด แสดงว่ามีความผิดปกติของโรคนี้ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวไม่สะดวกในทางปฏิบัติและไม่มี ความจำเป็นทางคลินิก อนึ่งพลาสมาเซรูโลพลาสมีน อาจมีระดับน้อยกว่าปกติได้ จากภาวะอื่น เช่น ภาวะขาดอาหารรุนแรง, โรคไตที่สูญเสียโปรตีนมากทางปัสสาวะ, โรคตับแข็ง เป็นต้น แต่ระดับจะต่ำเพียงเล็กน้อย โดยไม่ต่ำมากจนค่าใกล้ค่า 0 เช่นในโรควิลสัน ผู้ป่วยโรควิลสัน อาการจะเริ่มเร็วหรือช้า และมากหรือน้อย ขึ้นกับปริมาณทองแดงที่คั่งในร่างกาย ส่วนใหญ่จะเริ่มแสดงอาการก่อนอายุ 40 ปี ช่วงอายุที่พบบ่อยคือ 5 - 30 ปี ในผู้ป่วยที่เป็นเด็กมักมีอาการทางโรคตับ เช่น ตับอักเสบรุนแรง หรือตับแข็ง โดยหาสาเหตุได้ไม่ชัด แต่ในผู้ใหญ่มีอาการทางตับร่วม กับอาการทางระบบประสาทที่รุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ จากการคั่งของทองแดง เช่น เริ่มจากอาการเกร็งของแขนขา มีความผิดปกติในการเคลื่อนไหว การทรงตัวและการพูด ตลอดถึงความผิดปกติทางจิตเวช ในปัจจุบันการรักษาโรควิลสันโดยใช้ยา penicillamine หรือ trientine ซึ่งออกฤทธิ์แย่งจับทองแดงและเพิ่มการขับถ่ายทางปัสสาวะ จะช่วยให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นมาก และยับยั้งการดำเนินต่อไปของโรคได้ ดังนั้นถ้าสามารถให้การวินิจฉัยโรคได้ถูกต้องและรวดเร็วเท่าใด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่ยังไม่มีอาการของโรคก็จะสามารถป้องกันการเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยได้ดีขึ้น

จะเห็นได้ว่าค่าซีรัมเซรูโลพลาสมีนมีความสำคัญมากในการช่วยวินิจฉัยโรควิลสัน เพื่อนำไปสู่การรักษาโรคนี้ให้มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการวิเคราะห์ค่าโปรตีนนี้ทางห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องได้ค่าที่ถูกต้องเชื่อถือได้ อีกทั้งมีการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์

ที่ได้มาตรฐานในระดับสากล ในปัจจุบันการวิเคราะห์ที่ใช้กันส่วนใหญ่และทำมานานแล้วเป็นวิธีเอนไซม์⁸⁻¹⁰ ที่อาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซรูโลพลาสมีนทำให้เกิดสีกับซับสเตรท วิธีนี้ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และใช้เครื่องมือ spectrophotometer ชนิดธรรมดาที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่มีข้อจำกัดตรงที่ไม่สามารถหาค่ามาตรฐาน และคอนโทรลซีรัมเพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพในการวิเคราะห์ได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์แบบเดิมกับแบบใหม่โดยวิธีอิมมูโน¹⁰⁻¹¹ ที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูป ของ Dade Behring Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีน้ำยามาตรฐานและคอนโทรลซีรัมครบถ้วน เป็นที่ยอมรับทั่วไป สำหรับการอ่านค่าความขุ่นที่เกิดจากปฏิกิริยาจำเพาะนี้สามารถทำได้อย่างรวดเร็วโดยเครื่องอัตโนมัติตามหลักการของ Nephelometry

งานวิจัยเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ และความแตกต่างของซีรัมเซรูโลพลาสมีนซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี เอนไซม์และวิธีอิมมูโนที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูปทั้งที่ระดับปกติของกลุ่มคอนโทรล และที่ระดับต่ำมากของผู้ป่วยโรควิลสัน

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. กลุ่มทดลอง

1.1 กลุ่มคอนโทรล 22 คนได้แก่นักศึกษาแพทย์ 10 คน ที่มีสุขภาพแข็งแรง อายุระหว่าง 18-20 ปี เป็นชาย 5 คน และหญิง 5 คน ส่วนอีก 12 คน เป็นผู้ป่วยที่รับไว้ในโรงพยาบาลศิริราชด้วยโรคต่าง ๆ ที่ไม่ใช่โรควิลสัน เป็นชาย 11 คน และ หญิง 1 คน อายุระหว่าง 16 - 52 ปี ทุกรายมีระดับเซรูโลพลาสมีนปกติ

1.2 ผู้ป่วยโรควิลสันที่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากแพทย์เฉพาะทางแล้ว จำนวน 7 คน

2. การวิเคราะห์ระดับเซรูโลพลาสมีนด้วยวิธีเอนไซม์ (enzymatic assay) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

ใช้หลักการของปฏิกิริยาสีโดยให้เซรูโลพลาสมีน ที่มีฤทธิ์เป็นเอนไซม์ออกซิเดสทำการย่อยซับสเตรท และเกิดสีขึ้น จากนั้นจึงอ่านค่าที่บ่งแสงที่คลื่นแสง 530 นาโนเมตร 8 การวิเคราะห์เริ่มจากการดูดน้ำยา acetate buffer 8 มล. ใส่ในหลอดทดลอง 2 หลอดโดยให้หลอดที่ 1 เป็นน้ำยา blank และหลอดที่ 2 เป็นหลอดทดลอง เมื่อเติมซีรัม 0.1 มล. ลงในหลอดที่ 2 แล้ว จึงอุ่นหลอดทั้งสองที่อุณหภูมิ 37 ° ซ นาน 5 นาที จากนั้นจึงเติมซับสเตรท (0.5% PPD) 1 มล. ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันดีแล้วอุ่นหลอดทั้งสองที่อุณหภูมิ 37 ° ซ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเติมที่ จากนั้นจึงเติม 0.5% sodium azide 1 มล. ในหลอดทั้งสองเพื่อยุติปฏิกิริยาการย่อย หลังจากผสมกันดีแล้วจึงเติมซีรัม 0.1 มล. ลงในหลอด Blank ทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาสิ้นสุดอย่างสมบูรณ์หลังจากแช่หลอดทั้งสองที่อุณหภูมิ 0-4 ° ซ นาน 30 นาที จึงนำไปอ่านค่าความทึบแสงที่ 530 นาโนเมตร

การคำนวณ

ปริมาณเซรูโลพลาสมีน มก. /ดล. = (A test - A blank) x 87.5

A test = ความทึบแสงจากหลอดทดลอง

A blank = ความทึบแสงจากหลอด blank

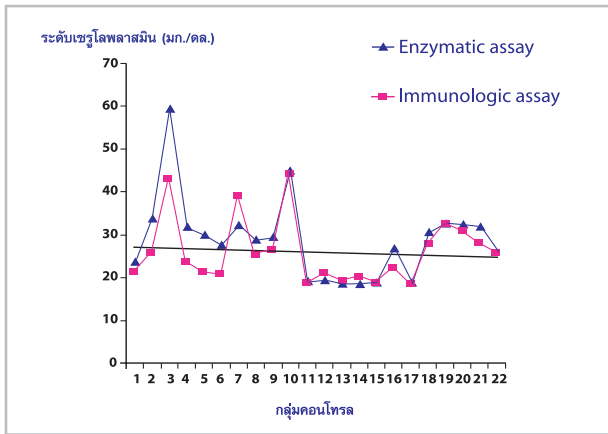
87.5 = ค่าคงที่ที่เปลี่ยนค่าความทึบแสงจากปฏิกิริยาให้เป็นปริมาณเซรูโลพลาสมีน(มก. /ดล.)⁸⁻⁹

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้

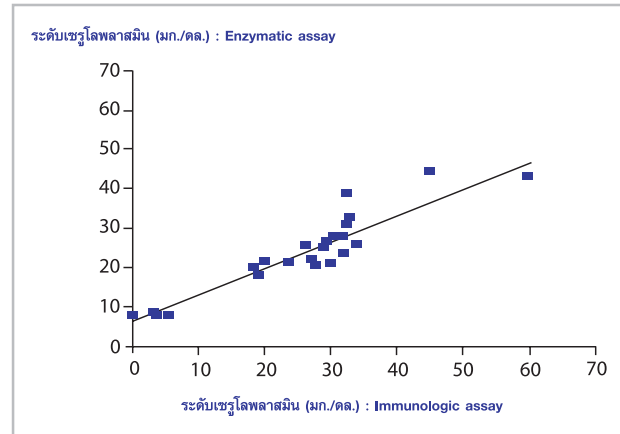
0.4M acetate buffer pH 5.5

0.5% p-phenylene diamine (PPD)

0.5% sodium azide



รูปที่ 1. กราฟแสดงความสัมพันธ์ทางสถิติของระดับเซรูโลพลาสมีนในกลุ่มคอนโทรลที่วิเคราะห์โดยวิธี เอนไซม์โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer กับวิธีอิมมูโนโดยใช้เครื่อง Nephelometer



รูปที่ 2. สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ของระดับเซรูโลพลาสมีนในกลุ่มคอนโทรลและกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่วิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์ โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer กับวิธีอิมมูโนโดยใช้เครื่อง Nephelometer ได้ $r = 0.8713$, $p\text{-value} < 0.01$

3. การวิเคราะห์ระดับเซรูโลพลาสมีนด้วยวิธีอิมมูโน (immunologic assay) โดยใช้เครื่อง Nephelometer

ใช้หลักการทางอิมมูโนวิทยา ที่อนุของเซรูโลพลาสมีนในซีรัมจะเป็นแอนติเจนที่จับอย่างจำเพาะกับเซรูโลพลาสมีนแอนติบอดีในน้ำยาสำเร็จรูปได้เป็นตะกอนของ antigen / antibody complex และมีความขุ่นเกิดขึ้น ซึ่งสามารถวัดค่าได้โดยเครื่อง Nephelometer เครื่องมือนี้จะทำงานโดยอัตโนมัติในการดูดน้ำยาและอ่านค่าความขุ่นที่เกิดขึ้น พร้อมกับการคำนวณปริมาณที่วิเคราะห์ได้โดยเทียบกับน้ำยามาตรฐาน

น้ำยาที่ใช้วิเคราะห์

antiserum to human ceruloplasmin (Dade Behring Inc, Newark, DE, USA): เป็นน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจวิเคราะห์หาระดับเซรูโลพลาสมีนในซีรัมด้วยวิธี immunoturbidimetry

สารละลายมาตรฐาน มีความเข้มข้นของเซรูโลพลาสมีน 0.321 ก./ดล. ทำการเจือจางในอัตราส่วน 1/2 1/4 1/10 1/20 1/40 1/80 เท่า ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 126 65 32 15 8 4 และ 0 มก./ดล. ตามลำดับ

คอนโทรลซีรัมมีความเข้มข้นของเซรูโลพลาสมีน 0.281 ก./ดล. (อ่านค่าได้ 0.292 - 0.396 ก./ดล.)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิมมูโนโดยใช้น้ำยามาตรฐานและคอนโทรลซีรัมที่มีอยู่ในชุดน้ำยาสำเร็จรูปหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าซีรัมเซรูโลพลาสมีนในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ ด้วยวิธีเอนไซม์และวิธีอิมมูโน นำมาคำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์โดยใช้ Pearson's correlation coefficient (r),¹³

ผลการศึกษา

คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนความแปรปรวน (%CV) ของการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิมมูโนโดยได้ 3.6% สำหรับการเปรียบเทียบภายในกลุ่ม 9 ครั้ง และได้ 0.362% สำหรับการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 4 ครั้ง ค่าที่ได้นี้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้แสดงถึงความคงที่ของการวิเคราะห์

จากการหาค่าซีรัมเซรูโลพลาสมีนในกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ พบว่า

มีค่าต่ำกว่าค่าจากกลุ่มคอนโทรลอย่างชัดเจน ($p\text{-value} < 0.0001$) ทั้งจากการวิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์และวิธีอิมมูโน ในกลุ่มคอนโทรลจำนวน 22 คน อายุระหว่าง 12 ถึง 52 ปี (ตารางที่ 1) โดยการวิเคราะห์ ด้วยวิธีเอนไซม์ ได้ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 28.94 ± 9.60 มก./ดล. และโดยวิธีอิมมูโน 25.91 ± 7.71 มก./ดล. ค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ค่าปกติคือมากกว่า 13 มก./ดล. (เกณฑ์ปกติในคนไทย) จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าของซีรัมเซรูโลพลาสมีนที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำค่าซีรัมเซรูโลพลาสมีนมาเปรียบเทียบกัน พบว่าข้อมูลของทั้ง 2 กลุ่มที่ได้มีความสัมพันธ์กันในลักษณะของกราฟเส้นตรง (รูปที่ 1) และการหาความสัมพันธ์ทางสถิติของระดับซีรัมเซรูโลพลาสมีนจากสองวิธีโดยหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ได้ค่า $r = 0.8713$, $p\text{-value} < 0.01$ (รูปที่ 2)

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีค่าซีรัมเซรูโลพลาสมีนต่ำผิดปกติคือน้อยกว่า 13 มก./ดล. จำนวน 7 คน ซึ่งมีอายุระหว่าง 10 ถึง 37 ปี (ตารางที่ 2) จากการวิเคราะห์หาระดับซีรัมเซรูโลพลาสมีน ด้วยวิธีเอนไซม์ได้ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.58 ± 2.28 มก./ดล. และวิธีอิมมูโนได้ค่าในผู้ป่วยทุกรายน้อยกว่า 8 มก./ดล. (เป็นค่าน้อยที่สุดที่เครื่องอ่านได้) เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับเซรูโลพลาสมีนที่ต่ำมาจากทั้งสองวิธี ได้ผลไม่แตกต่างกันดังตารางที่ 1, รูปที่ 1 และ ตารางที่ 2

อนึ่งได้ศึกษาดูความคงทนของซีรัมเซรูโลพลาสมีนของคนปกติที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ราว 25 °ซ) นานตั้งแต่ 0, 5, 10 และ 15 วัน เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยวิธีเอนไซม์และวิธีอิมมูโนพบว่าค่าเซรูโลพลาสมีนที่ได้จากทั้งสองวิธี ไม่แตกต่างกันแต่ค่าจะคงที่อยูระหว่าง 20.12 - 24.20 มก./ดล. จากช่วงเวลา 0 ถึง 10 วันเท่านั้น หลังจากนั้นค่าจะลดลงมาก อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ได้เก็บซีรัมไว้ที่ -20 °ซ ตลอดเวลาที่รอการวิเคราะห์เพื่อให้ค่าคงที่มากที่สุด

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์หาระดับซีรัมเซรูโลพลาสมีน ด้วยวิธีเอนไซม์ดัดแปลงโดย Ravin HA⁸⁻¹⁰ ใช้หลักการของปฏิกิริยาสปีโดให้เซรูโลพลาสมีน ที่มีฤทธิ์เป็นเอนไซม์ออกซิเดสทำการย่อยยับสเตรท PPD และเกิดสีขึ้น จากนั้นจึงอ่านค่าที่บ่งแสงที่เกิดขึ้นที่คลื่นแสง 530

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบระดับเซรูโลพลาสมีนในกลุ่มคอนโทรลที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์ โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer กับ วิธีอิมมูโนโดยใช้เครื่อง Nephelometer (เลขที่ 1 ถึง 10 เป็นนักศึกษาแพทย์ เลขที่ 11 ถึง 22 เป็นผู้ป่วยโรคอื่นที่ไม่ใช่โรคไต)

ชื่อ	เพศ	อายุ (ปี)	ค่าเซรูโลพลาสมีน (มก./ดล.) ในกลุ่มคอนโทรล	
			Enzymatic assay ค่าปกติ (13-28 มก./ดล.)	Immunological assay ค่าปกติ (20-60 มก./ดล.)
ป.ล	ช	19	18.40	20.00
ก.ส	ช	19	18.80	18.50
ณ.ช	ช	19	27.10	22.00
น.ศ	ช	19	18.80	18.20
ก.อ	ช	20	18.40	18.90
ค.ว	ญ	18	32.30	30.90
ภ.ป	ญ	19	30.60	27.60
น.ว	ญ	19	32.80	32.40
ณ.ค	ญ	19	31.90	27.80
ป.ค	ญ	20	26.20	25.50
พ.ค	ช	12	23.60	21.0
ว.ศ	ช	21	19.40	18.40
น.ท	ช	22	33.90	25.60
ป.ล	ช	22	29.96	21.00
ท. ล	ช	27	19.50	20.70
ส.ช	ช	42	31.85	23.50
ว.ห	ช	43	29.50	26.40
อ.ก	ช	52	45.00	44.20
ณ.พ	ญ	12	27.70	20.60
ร.ค	ญ	30	32.37	38.80
พ.ร	ญ	33	28.87	25.10
ก.ช	ญ	51	59.70	43.10
Mean $\pm$ SD			28.94 $\pm$ 9.60	25.91 $\pm$ 7.71

ตารางที่ 2. เปรียบเทียบระดับซีรัมเซรูโลพลาสมีนในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer กับวิธีอิมมูโนโดยใช้เครื่อง Nephelometer

ชื่อ	เพศ	อายุ (ปี)	ค่าเซรูโลพลาสมีนในผู้ป่วยโรคไต (มก./ดล.)		KF*
			enzymatic assay ค่าปกติ (13-28 มก./ดล.)	immunological assay ค่าปกติ (20-60 มก./ดล.)	
บ.ค	ช	10	3.2	8.3	+
ก.อ	ช	36	0	<8	+
ค.ร	ช	37	0	<8	+
ว.ห	ญ	10	0	<8	+
ม.ช	ญ	21	5.6	<8	+
ส.อ	ญ	22	0	<8	-
ว.ช	ญ	24	3.9	<8	+
Mean $\pm$ SD			1.58 $\pm$ 2.28	จำนวนไม่ได้	

*KF = Kayser-Fleischer ring (+ positive, - negative)

ตารางที่ 3. เปรียบเทียบระดับซีรัมเซรูโลพลาสมีนในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์ก่อนและหลังทำการรักษาด้วยยา penicillamine

ชื่อ	เพศ	อายุ (ปี)	ค่าเซรูโลพลาสมีนในผู้ป่วยโรคไต (มก./ดล.)		ระยะเวลารับในการรักษา (เดือน)
			ก่อนการรักษา	หลังการรักษา	
ก.อ.	ช	36	0	0	4
ม.ช	ญ	21	5.6	0	6
ว.ช	ญ	24	3.9	0	11

นาโนมิเตอร์ การวิเคราะห์นี้ใช้กันมานานแล้ว ราคาไม่แพงใช้เครื่องมือ spectrophotometer ธรรมดา อีกทั้งให้ความไวพอสมควรในการวิเคราะห์ จากผลการศึกษาที่ได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์ในซีรัมของกลุ่มคอนโทรลที่มีค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) โดยวิธีเอนไซม์ได้ 28.94 $\pm$ 9.60 มก./ดล. และวิธีอิมมูโนได้ 25.91 $\pm$ 7.71 มก./ดล. หรือที่ต่ำ่มาก ๆ ของผู้ป่วยโรคไตที่วิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์ได้ 1.58 $\pm$ 2.28 มก./ดล. และวิธีอิมมูโนได้น้อยกว่า 8 มก./ดล. พบว่าผลที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมีค่าไม่แตกต่างกัน และทุกค่ามีความสัมพันธ์อย่างดีโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ (r) ได้ 0.8713, p-value < 0.01 ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2 ดังนั้นวิธีเอนไซม์ ที่ใช้อยู่เดิมให้ความถูกต้องในการวิเคราะห์ซีรัมเซรูโลพลาสมีนได้ดีเท่า วิธีที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูปหากทำในห้องปฏิบัติการที่ผู้วิเคราะห์มีความชำนาญเป็นอย่างดี และการจัดเตรียมน้ำยาได้ถูกต้องตามมาตรฐาน เนื่องจากค่าที่ได้โดยวิธีนี้ อาจมีปัญหาจากข้อผิดพลาดของเซรูโลพลาสมีน ดังนั้น 5% ของผู้ป่วยโรคไตที่มีปริมาณ apocerulo-plasmin ปกติ แต่ไม่สามารถจับทองแดงได้ ถ้าตรวจโดยวิธีอิมมูโน ซึ่งวัดค่าโปรตีนรวมทั้งหมด จึงได้ค่าปกติ แต่ถ้าตรวจโดยวิธีเอนไซม์ ที่วัดเฉพาะค่าเซรูโลพลาสมีน ก็จะได้อ่านค่าผิดปกติ ซึ่งช่วยให้การวินิจฉัยผู้ป่วยในกลุ่มนี้ได้ถูกต้อง นอกจากนี้วิธีเอนไซม์ยังมีประโยชน์ในการติดตามผลการรักษาโรคไตที่ให้น้ำยาจับทองแดงติดต่อกันเป็นเวลานานมาก ๆ เช่น ในรายงานที่รักษานานเกิน 25 ปี¹⁰ ถ้า ผู้ป่วยมีระดับทองแดงในเลือดต่ำลงมาก จะทำให้ค่าเซรูโลพลาสมีน ที่วิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์ลดต่ำกว่าก่อนรักษาเป็นแนวทางพิจารณาปรับลดขนาดของยาจับทองแดงลง

อย่างไรก็ดีวิธีเอนไซม์ยังมีข้อจำกัดที่ไม่ได้รวมอยู่ในวิธีมาตรฐานสากล สำหรับการวิเคราะห์ซีรัมเซรูโลพลาสมีน เข้าใจว่าน่าจะเกิดจากความลำบากในการเตรียมสารมาตรฐานตลอดจนคอนโทรลซีรัม ให้มีค่าคงที่เนื่องจากฤทธิ์ของเอนไซม์ในซีรัมอาจเปลี่ยนแปลงได้หากเก็บรักษาน้ำยาไว้ไม่ดีพอ หรือแม้จะเก็บดีพอก็ยังไม่คงที่ เป็นผลให้การวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ง่าย อีกทั้งวิธีการวิเคราะห์ต้องใช้เวลาพอสมควรราว 3 ชั่วโมง และยังสามารถใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติได้ จึงไม่สะดวกเท่ากับวิธีอิมมูโนที่มีความจำเพาะและมีน้ำยาสำเร็จรูปใช้ โดยมีทั้งสารมาตรฐานและคอนโทรลซีรัม ที่อ่านค่าได้คงที่ในแต่ละครั้ง ช่วยควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์และเป็นวิธีที่ยอมรับในระดับสากลอีกทั้งการวิเคราะห์ทำได้โดยเครื่องอัตโนมัติ ที่สะดวก ใช้น้ำยาปริมาณน้อยและอ่านผลได้อย่างแม่นยำรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญพิเศษในการวิเคราะห์ แต่ก็มีข้อจำกัดอยู่ที่เครื่องมือ Nephelometer มีราคาแพงมาก และน้ำยาสำเร็จรูปก็มีราคาแพงเช่นกัน แม้จะใช้เพียงปริมาณน้อยมากก็ตาม อีกทั้งน้ำยายังมีอายุการใช้งานจำกัด ซึ่งจะเหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีการส่งตรวจ

ในปริมาณมาก และมีงบประมาณครุภัณฑ์เพียงพอ อย่างไรก็ตามก็ติดจากค่าที่วิเคราะห์ได้ในผู้ป่วยโรควิลสันซึ่งมีค่าต่ำมากโดยวิธีเอนไซม์สามารถอ่านค่าได้จนถึง 0 มก./ดล. ในขณะที่วิธีอิมมูโนอ่านค่าต่ำมากเหล่านั้นว่าน้อยกว่า 8 มก./ดล. เท่านั้น จึงไม่สามารถหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผู้ป่วยจากวิธีวิเคราะห์นี้ได้

อนึ่งข้อสังเกตจากผู้ป่วยโรควิลสัน 3 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยลำดับที่ 2, 5 และ 7 จากตารางที่ 2 ซึ่งทุกรายมีค่าซีรั่มเซรูโลพลาสมีนก่อนการรักษาได้ 0, 5.6 และ 3.9 มก./ดล.ตามลำดับ พบว่าหลังจากการรักษาด้วยยา penicillamine ที่เพิ่มการขับทั้งทองแดง ติดต่อกันเป็นเวลานานระหว่าง 4-11 เดือน จนอาการทั่วไปของโรคดีขึ้นมาก ได้ทำการวิเคราะห์ค่าซีรั่มเซรูโลพลาสมีนซ้ำ พบว่ายังคงมีระดับต่ำใกล้เคียงกับก่อนให้การรักษา (ตารางที่ 3) ผลดังกล่าวช่วยสนับสนุนว่าระดับซีรั่มเซรูโลพลาสมีนที่ลดต่ำลงในโรควิลสันนั้น น่าจะเกิดร่วมกับโรควิลสันเท่านั้น ไม่น่าเป็นผลมาจากภาวะพิษของทองแดงที่มีมากเกินไปในโรควิลสันและการสังเคราะห์โปรตีนนี้ เพราะถ้าเกิดจากสาเหตุดังกล่าวจริง เมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาขับทองแดง จนระดับทองแดงที่กั่งลดลงและอาการต่าง ๆ ของโรคดีขึ้น ระดับโปรตีนนี้ควรจะเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงปกติ อย่างไรก็ตามก็มีข้อแนะนำว่า การรักษาด้วยยาขับทองแดงที่ขนาดยาเดิมติดต่อกันเป็นเวลานาน เกิน 20 ปีอาจเกิดภาวะขาดทองแดง และทำให้ฤทธิ์ออกซิเดสของเซรูโลพลาสมีนที่วัดโดยวิธีเอนไซม์ลดต่ำลงมากใกล้เคียง 0 ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยเกิดการขาดเหล็กและซีดได้ จำเป็นต้องปรับลดขนาดยาให้เหมาะสมอย่างต่อเนื่อง¹²

สำหรับการตรวจพบ Kayser-Fleischer ring ในผู้ป่วยนั้น ช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรควิลสันได้ดีมาก จากรายงานนี้มีการตรวจพบถึง 6 ใน 7 ราย (85%) ของผู้ป่วยที่เป็นโรควิลสัน แม้ค่าอาจจะน้อยไปบ้างจากรายงานอื่นที่พบได้มากกว่า 90-95% น่าจะเป็นเพราะจำนวนผู้ป่วยในรายงานนี้ยังรวบรวมได้ไม่มากพอ คาดว่าสถิติจริงน่าจะไม่ได้แตกต่างกัน ดังนั้นผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ระดับซีรั่มเซรูโลพลาสมีนต่ำผิดปกติ (น้อยกว่า 13 มก./ดล.) ร่วมกับการมีประวัติของโรคนี้ในครอบครัวของผู้ป่วย และการตรวจพบความผิดปกติของตับ ระบบประสาทและตา ที่หาสาเหตุไม่พบในผู้ป่วยเหล่านี้ จะช่วยให้การวินิจฉัยโรควิลสันได้แม่นยำ ซึ่งจะนำไปสู่การรักษาที่เหมาะสมและได้ผลเต็มที่ต่อไป

สรุป

การวิเคราะห์ซีรั่มเซรูโลพลาสมีน ที่ลดต่ำลงในผู้ป่วยโรควิลสัน 7 รายและกลุ่มคอนโทรล 22 รายที่มีค่าปกติ ด้วยวิธีเอนไซม์ที่ใช้อยู่เดิม และวิธีอิมมูโนที่เป็นวิธีใหม่ที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูปนั้นทั้ง 2 วิธีได้

ค่าเชื่อถือได้ และมีความสัมพันธ์กัน วิธีเก่ามีราคาถูกกว่ามากและจะได้ค่าต่ำที่ถูกต้องในผู้ป่วยโรควิลสันทุกราย รวมทั้งที่มีระดับ apoceruloplasmin ไม่ต่ำ แต่เนื่องจากวิธีนี้ไม่น่าประสบความสำเร็จรูปใช้ควบคุณภาพ จึงจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ และใช้เวลาวิเคราะห์นานกว่า ส่วนวิธีใหม่มีข้อดีที่วิธีการง่ายกว่า การรายงานผลรวดเร็วโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ และใช้น้ำยาสำเร็จรูป รวมทั้งสามารถควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ได้ดี แต่มีข้อเสียที่อาจได้ค่าปกติในโรควิลสันที่ระดับ apoceruloplasmin ไม่ต่ำ ซึ่งพบได้ราว 5% ของผู้ป่วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาแพทย์และผู้ป่วยทุกรายที่ให้ความร่วมมือในการศึกษา คุณ จิราภรณ์ สนิธิ นักเทคนิคการแพทย์ภาควิทยาศาสตร์คลินิก ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง Nephelometer คุณเลิศชาย วชิรุตมางกูร ที่ช่วยประสานงานติดตามรายงานของผู้ป่วยโรควิลสัน และบริษัท Dade Behring (ประเทศไทย) ที่สนับสนุนน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในการวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

1. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, et al. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. New York: McGraw-Hill, Inc., 2005:1871-2313.
2. Weatherall DJ, Ledingham JG, Warrell DA. Oxford textbook of medicine. 13th ed. Oxford: Oxford University Press, 1996:1419-23.
3. Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. 11th ed. Oxford: Blackwell Science LTD, 1997:417-25.
4. Devin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlation. 5th ed. Wiley-Liss, John Wiley and sons, New York, 2002:106.
5. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, et al. Neurology in clinical practice. 2nd ed. Boston: Butterworth, Heinemann, 1996:1766-67.
6. ประภากรณันต์ ดำรงเดช, พัชรีย์ เลิศฤทธิ, อุชเชณี วงศ์มณี, นฤมล พาณิชกุล นิโบล เนื่องต้น. ระดับซีรั่มเซรูโลพลาสมีนในโรควิลสัน. สารศิริราช 2541;50:576-81.
7. นิโบล เนื่องต้น. โปรตีนในเลือดที่สำคัญทางการแพทย์ กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ธรรมสารจำกัด, 2540:38-40.
8. Ravin HA. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. J Lab Clin Med 1961; 58:161-5.
9. Brien OD. Laboratory manual of pediatric microbiological techniques. 4th ed. New York: Harper and Row Publisher Incorporated, 1968:109-10.
10. Macintyre G, Gutfreund KS, Wayne Martin WR, Camicioli R, Cox DW. Value of an enzymatic assay for the determination of serum ceruloplasmin. J Lab Clin Med 2004;144:294-301.
11. Louro MO, Tutor JC, Paz JM. Serum and plasma ceruloplasmin in humans. J Clin Chem Clin Biochem 1989;27:511-3.
12. Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. Clinical epidemiology. A basic science for clinical medicine. 2nd ed. Boston : Little Brown and Company, 1991:69-152.
13. ชูศรี วงศ์ตันนะ. เทคนิคการใช้สถิติเพื่อการวิจัย. เทพนครมิตรการพิมพ์, 2546:309-29.

เปรียบเทียบการวิเคราะห์ค่าซีรัมเชรูลอพลาสมินในผู้ป่วยโรควิลสันด้วยวิธีเอนไซม์กับวิธีอิมมูโนที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูป

รุ่งกิพย์ สร้อยอัมพรกุล ป.ร.ด.*, ศราวุธ จันทนุ วท.บ.*, วัฒนชัย โชคชัยวัตรกุล พ.บ.**, อุษะณี วงศ์มณี วท.บ.*, ภูมิ สุขธิติพัฒน์ พ.บ.*, นิโบล เนื่องต้น พ.บ.*

*ภาควิชาชีวเคมี, **ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กทม. 10700, ประเทศไทย

วัตถุประสงค์: ปริมาณซีรัมเชรูลอพลาสมินที่ลดต่ำลงพบได้ถึง 95 % ในผู้ป่วยโรควิลสัน จึงมีความสำคัญมากในการช่วยวินิจฉัยโรควิลสัน (Wilson disease) ซึ่งเป็นโรคกรรมพันธุ์ที่เซลล์ตับไม่สามารถขับถ่ายทองแดงทั้งในทางเดินน้ำดี เป็นผลให้มีทองแดงคั่งในร่างกายจนเกิดพิษและทำลายอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะสมองและตับ การวินิจฉัยโรคนี้ได้อย่างถูกต้องจะนำไปสู่การรักษาที่ได้ผลดี แม้จะต้องให้ยาติดต่อกันตลอดชีวิต ดังนั้นความถูกต้องในการวิเคราะห์ซีรัมเชรูลอพลาสมินมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการช่วยวินิจฉัยโรคนี้ คณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาเปรียบเทียบความเชื่อถือได้ของการวิเคราะห์ซีรัมเชรูลอพลาสมิน 2 วิธีคือ วิธีเอนไซม์ที่ใช้อยู่เดิม และวิธีอิมมูโนที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูปซึ่งเป็นวิธีใหม่

วิธีการ: นำซีรัมของผู้ป่วยโรควิลสัน 7 รายและคอนโทรล 22 ราย มาวิเคราะห์ด้วยวิธีเอนไซม์โดยวิธีของ Ravin ปี 1961 เปรียบเทียบกับวิธีอิมมูโน ที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Dade Behring Inc, Newark ประเทศสหรัฐอเมริกา

ผลการศึกษา: ค่าซีรัมเชรูลอพลาสมิน เฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในผู้ป่วย และกลุ่มคอนโทรลที่วิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์ได้ 1.58 ± 2.28 มก./ดล. และ 28.94 ± 9.60 มก./ดล. ตามลำดับ สำหรับวิธีอิมมูโนได้ค่าในผู้ป่วยทุกรายน้อยกว่า 8 มก/ดล.และกลุ่มคอนโทรลได้ 25.91 ± 7.71 มก./ดล. ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์กันมาก ($r = 0.8713$ และ $p\text{-value} < 0.01$) และได้ผลตรงกันที่ในผู้ป่วยโรควิลสันมีค่าต่ำกว่ากลุ่มคอนโทรลอย่างชัดเจน

สรุป: การวิเคราะห์ซีรัมเชรูลอพลาสมิน ของผู้ป่วยโรควิลสัน 7 รายและกลุ่มคอนโทรล 22 ราย ด้วยวิธีเอนไซม์ที่ใช้อยู่เดิม และวิธีอิมมูโนที่เป็นวิธีใหม่โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปนั้น ทั้ง 2 วิธี ได้ค่าเชื่อถือได้ และมีความสัมพันธ์กันอย่างดี สำหรับวิธีใหม่มิมีข้อจำกัดที่ต้องใช้น้ำยาสำเร็จรูปและเครื่องมือซึ่งมีราคาแพงกว่ามาก แต่มีข้อดีที่วิธีการง่ายกว่า โดยใช้เครื่องวิเคราะห์และอ่านอัตโนมัติ รวมทั้งมีน้ำยามาตรฐานที่ช่วยตรวจสอบคุณภาพของการวิเคราะห์ให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล