

Thesis Title	Multiplexing Immunoassay for the Diagnosis of Acute Kidney Injury
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Thanaporn Bovornvirakit
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Kwanchanok Viravaidya-Pasuwat
Program	Master of Science
Field of Study	Biological Engineering
Faculty	Engineering
B.E.	2554

Abstract

Acute kidney injury (AKI) previously known as acute renal failure (ARF) is becoming a new worldwide public health problem. A diagnosis of this disease using serum creatinine is still a problem in clinical practice due to the insensitivity of the technique. Therefore, a measurement of biomarkers responsible for AKI has received much attention in the past couple of years. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and cytokine interleukin-18 (IL-18) were reported as two of the early biomarkers for AKI. The most commonly used method to detect these biomarkers is an immunoassay. This study used a planar platform (microscope slide) instead of a well-based platform to perform an immunoassay using fluorescence for detection. The advantages of the planar platform include lower reagent consumption, simplicity, and cost-effectiveness. In this study, anti-human IL-18 antibody and anti-human NGAL antibody were immobilized onto a microscope slide using a covalent binding method. The system was used to perform a sandwich immunoassay to detect the concentrations of IL-18 and NGAL present in the sample. Make-up samples were diluted at the concentration between 10 to 1000 pg/ml for IL-18 and 10 to 1000 ng/ml for NGAL to create a calibration curve. The precision of the system was determined using the coefficient of variability (CV), which was found to be less than 10%. This result indicates that this system is highly reproducible. The plasma samples of patients with AKI and healthy controls were tested for IL-18 and NGAL content using the glass slide system via the multiplexing immunoassay technique. The performance of this immunoassay system was compared with that of the Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) to determine the diagnostic accuracy of this system. It was found that the measurements from both systems were statistically similar.

Keywords: Acute Kidney Injury/ Multiplexing Immunoassay/ Interleukin-18/ Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวินิจฉัยโรคไตวายเฉียบพลันโดยใช้เทคโนโลยี Multiplexing Immunoassay
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวธนภรณ์ บวรวิรกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. ขวัญชนก พสุวัต
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวภาพ
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
พ.ศ.	2554

บทคัดย่อ

โรคไตวายเฉียบพลัน เป็นปัญหาด้านสุขภาพที่สำคัญทั่วโลก ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคนี้ในทางคลินิก ทำได้โดย ดูการเปลี่ยนแปลงค่า เซรั่มครีเอตินิน (serum creatinine) ในเลือด แต่วิธีนี้ยังมีข้อเสียอยู่ เนื่องจากปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า เซรั่มครีเอตินิน มีหลายปัจจัย เช่น น้ำหนัก อายุ เพศ โภชนาการ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ไม่ได้เกี่ยวข้องโดยตรงกับไต ทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาที่ทันทั่วถึง ดังนั้นในช่วงสองสามปีที่ผ่านมา ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ จึงเข้ามามีบทบาทที่สำคัญ งานวิจัยจำนวนมากได้ระบุว่า ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับโรคไตวายเฉียบพลันมีหลายชนิด โดย neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) และ interleukin-18(IL-18) เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับโรคไตวายเฉียบพลันด้วย เนื่องจากมีงานวิจัยได้รายงานไว้ทั้ง IL-18 และ NGAL สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงได้ล่วงหน้า ก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการไตวาย เกิดขึ้น วิธีการตรวจวัดปริมาณที่ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพนิยมมากที่สุด คือ เทคนิค immunoassay งานวิจัยนี้ได้พัฒนารูปแบบการทำ immunoassay เป็นแบบระนาบ (planar platform) โดยใช้สไลด์แก้ว (microscope glass slide) เป็นพื้นผิววัสดุและใช้สารเรืองแสง (fluorescence) สำหรับการตรวจสอบ ข้อดีของแพลตฟอร์มระนาบนี้ คือ ปริมาณการใช้สารที่น้อยมากและมีประสิทธิภาพการตรึงแอนติบอดีที่ดีกว่า ในการศึกษาครั้งนี้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IL-18 และ NGAL จะถูกตรึงบนสไลด์โดยใช้วิธีโควาเลนต์ (covalent binding) โปรตีนทั้งสองชนิด จะถูกผูกเงื้องาที่ความเข้มข้นต่างกัน (10-1000 pg/ml สำหรับ IL-18 และ 10-1000 ng/ml สำหรับ NGAL) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ในการหาเชิงปริมาณ ความน่าเชื่อถือของระบบนี้ถูกกำหนดโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (CV) พบว่ามีค่า

น้อยกว่า 10% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับในงานวิจัย .ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยไตวายเฉียบพลัน และ
คนปกติถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ IL-18 และ NGAL ซึ่งทดสอบบนสไลด์แก้วโดยใช้
เทคนิค Multiplexing Immunoassay และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบนี้เมื่อเทียบกับการ
หาปริมาณโปรตีน 2 ชนิดโดยใช้วิธี Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) เพื่อดู
ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จากสไลด์แก้ว ผลการทดลองที่ได้พบว่า ปริมาณ โปรตีนทั้ง 2
ชนิด ที่วัดได้จากทั้ง 2 ระบบ มีค่าใกล้เคียงกันในทางสถิติ

คำสำคัญ : ไโรคไตวายเฉียบพลัน/ Multiplexing Immunoassay/ Interleukin-18/ Neutrophil
Gelatinase-associated Lipocalin