

## นิพนธ์ต้นฉบับ

## Original Article

## การนำหลุมสำหรับตรวจหาแอนติบอดีสำหรับเชื้อไวรัสเอดส์ ด้วยวิธี ELISA มาใช้ใหม่

### Reuse of ELISA Wells for HIV Antibody Testing

เรืองฤทธิ์ จินะเสน\* วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

Ruangrit Jinasen,\* B.Sc. (Med Tech)

วรศักดิ์ ศิริฟองนุกูล\* ป.วิทยาศาสตร์การแพทย์

Vorasak Siriphongnukul,\* Cert in

วิวัฒน์ อุทัยวริทย์\* พ.บ.

Med Lab Tech

ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ\*\* พ.บ.

Wat Uthaiworavit,\* M.D.

\* โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ เชียงราย

Pathom Sawanpanyalert,\*\* M.D.

\*\* กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

\* Chiangrai Regional Hospital, Chiangrai

\*\* Department of Medical Services, Ministry

of Public Health

#### บทคัดย่อ

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์ด้วยวิธี ELISA ถือได้ว่าเป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่ง และมักจะพบว่า มีน้ำยาเหลือในการตรวจแต่ละ test kit ในระหว่างเดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม 2537 โรงพยาบาล เชียงรายประชานุเคราะห์จึงได้ทำการทดลองนำหลุมเก่าที่ใช้แล้วที่ไม่มีตัวอย่างตรวจใดให้ผลบวกมาใช้ใหม่ โดยเก็บได้จำนวน 288 หลุม หลังจากล้างด้วยบัฟเฟอร์และซับให้แห้งแล้วจะนำมาแช่ตู้เย็นไว้เพื่อนำมาใช้ตรวจแบบ duplicate testing เทียบกับหลุมใหม่โดยเลือกน้ำเหลืองที่ส่งมาตรวจที่ห้อง serology มาตรวจโดยสุ่ม

จากการตรวจจำนวนทั้งสิ้น 269 รายพบว่า ค่าความซุกของ anti-HIV-positive เท่ากับร้อยละ 15.2 โดยมีค่าความไว ความจำเพาะ, positive predictive value และ negative predictive value เท่ากับร้อยละ 97.6, 99.6, 97.6 และ 99.6 ตามลำดับ และมีค่าสถิติ kappa เท่ากับร้อยละ 97.3 ประมาณสองในสามของค่า OD:cut-off ratio ของการตรวจด้วยหลุมเก่าจะอยู่ภายในร้อยละ 20 ของค่าของหลุมใหม่ ถึงแม้ว่าร้อยละของ false positive และ false negative จะน้อย แต่มีความสำคัญมากทางคลินิก ฉะนั้นการนำหลุมเก่ามาใช้ควรระวังเป็นพิเศษในการตรวจที่ไม่สามารถเชื่อมโยงผลเลือดกับผู้มาตรวจได้ และเลือดที่ผ่านการตรวจนั้นไม่ได้ถูกนำไปให้ผู้ป่วย เช่น ในการประมาณค่าความซุกของการติดเชื้อเอดส์ในกลุ่มเสี่ยง หรือเฉพาะในการตรวจซ้ำเลือดที่ให้ผลบวกด้วยการตรวจด้วยวิธี ELISA มาแล้วครั้งหนึ่ง

**ABSTRACT**

ELISA testing for HIV antibody has been accepted as a standard method. For each test kit, it is commonly found that some reagents are left while all wells are used up. From March through July 1994, Chiangrai Regional Hospital which is located in one of the epicenters of the HIV/AIDS epidemic and uses the testing extensively conducted this study to determine feasibility of reuse of the wells which were exposed to HIV-negative sera. 288 wells were collected, rinsed with buffer solution, dried with tissue paper and refrigerated. The old wells were used for testing for anti-HIV antibody in comparison with the new ones (duplicate testing). Sera used in this study were randomly selected from the ones sent to the serology laboratory of the hospital. The prevalence of anti-HIV-positive was 15.2% with sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of 97.6%, 99.6%, 97.6% and 99.6% respectively. The reliability of the old wells as compared to the new ones as measured by kappa statistic was 97.3%. About two-thirds of the OD:cut-off ratios of the old wells were within 20% of those of the new ones. Although false positive and false negative rates were small, their clinical importance was immense. Therefore, reuse of ELISA wells should be limited only to estimation of HIV seroprevalence of high-risk groups where blood is tested in an unlinked and anonymous fashion and will not be used for transfusion, and to repeat testing of previously ELISA-tested HIV-positive sera.

**บทนำ**

การแพร่ระบาดของรวดเร็วและแพร่หลายของการติดเชื้อเอดส์ในประเทศไทยเป็นที่ตระหนักกันดีทั้งภายในและนอกประเทศ การที่จะบอกถึงร่องรอยของการติดเชื้อเอดส์นั้นมักอาศัยการตรวจเลือดหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์เป็นหลัก ซึ่งวิธีการที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีการมาตรฐานก็คือการทดสอบด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือวิธี direct และ indirect การตรวจดังกล่าวได้ใช้ในการตรวจเลือดในกลุ่มประชากรต่างๆมาตั้งแต่เริ่มต้นของการระบาดเช่น กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดเป็นนโยบายตั้งแต่ปี พ.ศ.2532 ว่าเลือดที่บริจาคทุกขวดจะต้องผ่านการตรวจหาแอนติบอดีต่อการติดเชื้อเอดส์ นอกจากนั้น ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2532 เป็นต้นมา กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข โดยความช่วยเหลือของสำนักงานคณะกรรมการระบาดวิทยาแห่งชาติ (ปัจจุบันคือสถาบันวิจัยสาธารณสุขไทย) ได้ริเริ่มให้มี

การเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ (sentinel surveillance) การติดเชื้อเอดส์ในกลุ่มเสี่ยงต่างๆโดยได้ดำเนินการเป็นประจำทุก 6 เดือน ซึ่งในการตรวจเลือดดังกล่าวได้ใช้การตรวจวิธี ELISA เป็นหลัก และมีการใช้ test kits ดังกล่าวเป็นจำนวนมาก

ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์ด้วยวิธี ELISA นั้น มักจะมีปรากฏการณ์ที่พบบ่อยๆคือ น้ำยาตรวจที่บริษัทบรรจุมามีเหลือเมื่อเทียบกับจำนวนหลุม (well) ที่แนบมาให้ ทำให้ต้องทิ้งน้ำยาเหล่านั้นไปอย่างน่าเสียดาย โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ ซึ่งเป็นโรงพยาบาลศูนย์ขนาด 720 เตียงในสังกัดกระทรวงสาธารณสุขที่อยู่ในจังหวัดเชียงราย ซึ่งจัดว่าเป็นจังหวัดที่เป็นศูนย์กลาง (epicenter) ของการระบาดของติดเชื้อเอดส์ในเขตภาคเหนือตอนบน และมีการใช้น้ำยาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์เป็นจำนวนมาก จึงได้มีดำริที่จะทดลองนำหลุมที่ใช้สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์ที่ตรวจแล้วให้ผลลบนำมาใช้ใหม่ (reuse) กับน้ำยาที่เหลือ

เพื่อพิสูจน์ความเป็นไปได้ ตลอดจนข้อดีและข้อเสียที่อาจเกิดขึ้น

หนึ่ง ผู้วิจัยได้ศึกษาเบื้องต้นโดยเลือกน้ำเหลืองที่ตรวจด้วยหลุมใหม่แล้วให้ผลบวกจำนวน 359 ราย และที่ตรวจแล้วให้ผลลบจำนวน 360 รายมาตรวจซ้ำโดยใช้หลุมเก่าพบว่าในรายที่ตรวจให้ผลลบโดยหลุมใหม่จะตรวจให้ผลลบโดยหลุมเก่าทั้งหมด ส่วนรายที่ตรวจแล้วให้ผลบวกโดยหลุมใหม่นั้น ตรวจให้บวกโดยหลุมเก่า จำนวน 353 ราย และตรวจให้ผลลบ 6 ราย ซึ่งทั้ง 6 รายนี้เมื่อนำไปตรวจซ้ำโดยใช้หลุมใหม่ก็กลับให้ผลลบเช่นกัน

### วัตถุประสงค์และวิธีการศึกษา

ในระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนกรกฎาคม 2537 เจ้าหน้าที่ห้องตรวจ serology ของโรงพยาบาลเชียงราย ประจวบคีรีขันธ์ ได้เก็บหลุมที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์ด้วยวิธี ELISA ยี่ห้อ Enzygnost HIV1/HIV2 ของบริษัท Behring ซึ่งเป็นการตรวจ ELISA แบบ indirect method โดยเลือกแถบของหลุมที่ให้ผลลบทั้งแถวเท่านั้น ถ้ามีแม้แต่หนึ่งตัวอย่างในแถวนั้นที่ตรวจแล้วให้ผลบวก จะไม่เก็บหลุมในแถวนั้นมาทดลอง โดยในการที่เก็บหลุมมาทดลอง ได้ข้ามขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรด ทั้งนี้ เก็บได้จำนวน 36 แถว รวมทั้งสิ้น 288 หลุม โดยนำหลุมเหล่านั้นไปล้าง (rinse) ด้วยบัฟเฟอร์ ซับให้แห้งและนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น จากนั้น ได้นำหลุมดังกล่าวมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์ด้วยน้ำยายี่ห้อดังกล่าว โดยใช้ น้ำเหลืองที่ส่งมาที่ฝ่าย serology โดยแบ่งน้ำเหลืองเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งตรวจโดยใช้หลุมใหม่ และอีกส่วนหนึ่งตรวจด้วยหลุมเก่า (หลุมที่ใช้แล้ว) กล่าวคือ การตรวจเป็นแบบ duplicate testing ในการตรวจทั้งโดยใช้หลุมใหม่ และหลุมเก่าจะมีการทำ

positive control และ negative control ตามปกติ การเลือกน้ำเหลืองที่ส่งมาที่ห้อง serology เพื่อนำมาตรวจในการทดลองนี้กระทำโดยสุ่ม (random)

การวิเคราะห์ได้เปรียบเทียบผลที่ได้ (บวกหรือลบ) ของหลุมเก่าเทียบกับหลุมใหม่ โดยใช้หลุมใหม่เป็น gold standard แล้วคำนวณหาค่าความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), positive predictive value (PPV), และ negative predictive value (NPV) อีกทั้งยังมีการคำนวณหาค่าความเชื่อถือได้ (reliability) โดยหาค่า observed agreement และค่าสถิติ kappa ด้วย<sup>(1)</sup>

นอกจากนั้น ยังได้มีการเปรียบเทียบอัตราส่วนของค่า optical density (OD) เทียบกับค่า cut-off ที่ได้จาก control ของหลุมเก่าเทียบกับหลุมใหม่ด้วย

### ผลการศึกษา

ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว มีน้ำเหลืองที่สุ่มมาตรวจได้ทั้งสิ้น 269 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ตรวจแล้วพบว่า ให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์ด้วยวิธี ELISA โดยใช้หลุมใหม่ จำนวน 41 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.2 ในจำนวน 269 รายนั้น 40 รายให้ผลบวกทั้งการตรวจโดยใช้หลุมเก่าและหลุมใหม่, 227 รายให้ผลลบทั้งการตรวจโดยใช้หลุมเก่าและหลุมใหม่, 1 รายที่ตรวจด้วยหลุมใหม่ให้ผลบวก แต่ตรวจโดยใช้หลุมเก่าให้ผลลบ (false negative) และ 1 รายที่ตรวจโดยใช้หลุมใหม่ให้ผลลบ แต่ตรวจโดยใช้หลุมเก่าให้ผลบวก (false positive) ดังตารางที่ 1 โดยคิดเป็นค่าความไว, ความจำเพาะ, PPV และ NPV ร้อยละ 97.6, 99.6, 97.6 และ 99.6 ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าความเชื่อถือได้ของหลุมเก่าเทียบกับหลุมใหม่ พบว่ามีความสอดคล้องกันของผลการตรวจ (observed agreement) เท่ากับร้อยละ 99.3

และค่าสถิติ kappa เท่ากับร้อยละ 97.3

รายที่เป็น false negative ปรากฏว่า เมื่อตรวจด้วยหลุมใหม่ได้ค่า OD เท่ากับ 0.507 (cut-off = 0.290, ratio เท่ากับ 1.748) แต่เมื่อตรวจด้วยหลุมเก่าพบว่าค่า OD เท่ากับ 0.190 (cut-off = 0.281) ทั้งนี้พบว่า ในจำนวน 41 รายที่ตรวจด้วยหลุมใหม่แล้วให้ผลเป็นบวก มีเพียง 2 รายเท่านั้นที่มีค่า OD:cut-off ratio ต่ำกว่า 2 ซึ่งตัวอย่างที่ตรวจได้ false negative นี้เป็นหนึ่งในสองรายนั้น นอกนั้นมีค่า OD:cut-off ratio สูงกว่า 7 ทั้งสิ้น

รายที่ตรวจพบว่าเป็น false positive ปรากฏว่า เมื่อตรวจด้วยหลุมเก่าได้ค่า OD เท่ากับ 0.358 (cut-off = 0.253 และค่า ratio เท่ากับ 1.415) และเมื่อตรวจด้วยหลุมใหม่ได้ค่า OD เท่ากับ 0.006 (cut-off = 0.253) ทั้งนี้ พบว่าในจำนวน 41 รายที่ตรวจว่าให้ผลบวกเมื่อใช้หลุมเก่า มีเพียงสองรายเท่านั้นที่ OD:cut-off ratio มีค่าต่ำกว่า 2 และรายที่ false positive นี้เป็นหนึ่งในสองรายนั้น นอกนั้นมีค่า OD:cut-off ratio สูงเกิน 5.5 ทั้งสิ้น

ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นจำนวนและร้อยละของผลการตรวจด้วยหลุมเก่าที่ให้ค่า OD:cut-off ratio อยู่ในช่วงร้อยละที่ระดับต่าง ๆ ของค่า OD:cut-off ratio

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเอดส์เมื่อใช้หลุมเก่าเทียบกับหลุมใหม่

		หลุมใหม่	
		ผลบวก	ผลลบ
หลุมเก่า	ผลบวก	40	1
	ผลลบ	1	227

ที่ได้จากการตรวจด้วยหลุมใหม่ พบว่าร้อยละ 25, 50 และ 75 ของค่า OD:cut-off ratio เมื่อตรวจด้วยหลุมเก่ามีค่าอยู่มากกว่าหรือน้อยกว่าค่า OD:cut-off ratio ที่ได้จากการตรวจด้วยหลุมใหม่ไม่เกินประมาณร้อยละ 5, 15 และ 30 ตามลำดับ

## วิจารณ์

การที่พบว่า การตรวจโดยใช้หลุมเก่าให้ค่าความไวและความจำเพาะสูงเมื่อเทียบกับการตรวจโดยใช้หลุมใหม่ และการที่ประมาณสองในสามของค่า OD:cut-off ratio จากการตรวจด้วยหลุมเก่าจะอยู่ภายในช่วงร้อยละ 20 ของค่าของหลุมใหม่ ทั้งที่หลุมเก่าผ่านการล้างมาแล้ว แสดงว่าการล้างน่าจะไม่ได้ล้างเอา antigen ที่เคลือบที่หลุมออก หรือล้างออกแต่ก็ไม่หมด การที่พบว่ามีค่า PPV และ NPV สูงนอกจากจะเป็นเพราะค่าความไวและความจำเพาะของการตรวจด้วยหลุมเก่าเทียบกับหลุมใหม่สูงแล้ว ยังเป็นเพราะในตัวอย่างนี้มีค่าความชุกของการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อเอดส์สูงถึงร้อยละ 15.2 แต่อย่างไรก็ตาม จากการที่พบว่าในขนาดตัวอย่างทั้งสิ้น 269 ตัวอย่าง พบว่ามี false negative และ false positive อย่างละหนึ่งรายนั้น นับได้ว่ามีความสำคัญในทางคลินิก

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบค่า OD:cut-off ratio ของการตรวจด้วยหลุมเก่าเทียบกับหลุมใหม่

ภายในช่วงร้อยละ (มากกว่าหรือน้อยกว่า) ของหลุมใหม่	จำนวน	(ร้อยละ)
± 2.5%	45	(16.7)
± 5.0%	76	(28.3)
± 10.0%	116	(43.1)
± 15.0%	148	(55.0)
± 20.0%	172	(63.9)
± 25.0%	188	(69.9)
± 30.0%	202	(75.1)
± 35.0%	205	(76.2)
± 40.0%	210	(78.1)
± 50.0%	222	(82.5)
± 60.0%	226	(84.0)
± 70.0%	230	(85.5)
± 80.0%	237	(88.1)
± 90.0%	247	(91.8)
± 95.0%	249	(92.6)
± 97.5%	250	(92.9)

เพราะหากนำเอาหลุมเก่าไปใช้ในการตรวจเลือดที่  
บริจาค แล้วไปเจาะรายที่เป็น false negative จะเป็น  
อันตรายต่อผู้ที่ได้รับเลือดนั้นเป็นอย่างมาก ใน  
ทำนองเดียวกันหากนำหลุมเก่าไปตรวจผู้ที่มาขอ  
ตรวจเลือดแบบนิรนาม (anonymous testing)  
และเผชิญไปเจาะรายที่เป็น false positive สามารถ  
ก่อให้เกิดความเสียหายได้อย่างมาก หากแจ้งผลให้ผู้  
มารับการตรวจทราบ โดยไม่ได้ตรวจยืนยัน ทั้งนี้ ถึง

แม้ว่าผู้ที่เป็น false negative และ false positive  
มักจะมีค่า OD:cut-off ratio ที่ต่างจากตัวอย่างอื่น  
อย่างชัดเจนจนสามารถใช้เป็นเกณฑ์ที่กำหนดว่าจะ  
ต้องตรวจซ้ำด้วยหลุมใหม่ก็ตาม

นอกจากนั้น ยังมีปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นได้โดยที่  
ไม่ได้คาดคิดมาก่อนก็ได้ หากนำหลุมเก่ามาตรวจ เช่น  
หลุมที่มากับน้ำยาแต่ละรุ่นอาจจะมี ความคงตัวต่อ  
การล้างไม่เท่ากัน (lot-to-lot variation) คือ บางรุ่น

มีความคงตัวดี บางรุ่นมีความคงตัวไม่ดี ทำให้ได้ผลที่ไม่สม่ำเสมอ นอกจากนั้น ยังอาจจะมีปัญหาในแง่ของข้อกำหนด กล่าวคือ บริษัทผู้ผลิตไม่รับผิดชอบในผลที่อาจจะเกิดขึ้นหากมีการนำเอาหลุมเก่ามาใช้ เพราะไม่ใช่สิ่งที่ทางบริษัทแนะนำให้ปฏิบัติ และถือว่าเป็นการใช้ผลิตภัณฑ์อย่างผิดวิธี (misuse)

แต่อย่างไรก็ตาม การใช้หลุมเก่าอาจจะมิประโยชน์ในบางกรณี เช่น ในกรณีที่ตรวจหาอัตราความชุกของการติดเชื้อเอดส์ในกลุ่มเสี่ยงในลักษณะที่ไม่สามารถจะบอกได้ว่าเลือดนั้นเป็นของใคร (unlinked anonymous) ไม่มีการแจ้งผลเลือดแก่ผู้ถูกตรวจ และเลือดที่ผ่านการตรวจแล้วไม่ได้นำไปให้ผู้ป่วย ซึ่งก็ได้แก่การเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ การใช้หลุมเก่าในกรณีนี้จะมีประโยชน์ตรงที่จะสามารถประหยัดงบประมาณได้มาก และไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผู้ใด การหาค่าความชุกดังกล่าวจะได้ผลที่ถูกต้อง (accurate) พอสมควร ถ้าเป็นกลุ่มเสี่ยงที่มีอัตราความชุกสูง ร้อยละของ false positive และ false negative ที่ไม่สูงมาก

## เอกสารอ้างอิง

1. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions, 2nd ed. New York: John Wiley, 1981.

จะไม่ทำให้การประมาณค่าความชุกผิดไปมากนัก นอกจากนั้น การนำหลุมเก่ามาใช้ ยังอาจจะเป็นประโยชน์ในกรณีที่ต้องการตรวจซ้ำในตัวอย่างที่ให้ผล ELISA บวกมาแล้วครั้งหนึ่ง

อนึ่ง การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงสำรวจ (exploratory) ซึ่งศึกษาหลุมสำหรับน้ำยาตรวจเพียงยี่ห้อเดียว และมีขนาดตัวอย่างไม่มากนัก หากจะให้ได้มาซึ่งผลการศึกษาที่ได้มาใช้ได้อย่างจริงจัง อาจจำเป็นต้องศึกษา หลุมจากหลายยี่ห้อ หลายรุ่น (lot) และมีจำนวนตัวอย่างที่มากกว่านี้ด้วย

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณแพทย์หญิงเรณู ศรีสมิต ผู้อำนวยการโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ที่อนุญาตให้ทำการศึกษานี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้อง serology ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการศึกษานี้ เป็นอย่างดี