วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 4 ฉบับที่ 1 ม.ค.–มี.ค. 2538

Journal of Health Science
Vol. 4 No.1 Jan.-Mar. 1995

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การประเมินประสิทธิภาพของ Dot Immunoassay ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี

Evaluation of a Dot Immunoassay for Diagnosis of HIV Infection

สุธน วงษ์ชีรี* วท.บ., วท.ม.
สุรางค์ สงวนวงศ์* วท.บ., Dip in Bact (Major in virology)
อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์* วท.บ.
อมรทิพย์ เมืองพรหม* วท.บ.
ไพจิตร์ วราชิต** พ.บ., ส.ม., ว.ว. (กุมารเวชศาสตร์)
* *สถาบันวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*
** *กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*

Suthon Vongsheree* B.Sc., M.Sc.
Suranga Saguanwongse* B.Sc., Dip in Bact (Major in Vilorogy)
Archawin Rojanawiwat* B.Sc.
Amorntip Muangporm* B.Sc.
Paijit Warachit** M.D., M.P.H., Board of Pediatrics
* *Virus Research Institute, Department of Medical Sciences.*
** *Department of Medical Sciences.*

บทคัดย่อ

ได้ประเมินประสิทธิภาพของวิธี Dot immunoassay ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี โดยใช้ตัวอย่างซีรัมที่ผ่านการตรวจวินิจฉัยยืนยันจำนวน 328 ตัวอย่างที่ตรวจพบบวกด้วยวิธี Western blot จำนวน 254 ราย และลบ 74 ราย พบว่า วิธีนี้ให้ผลบวกกับซีรัมชนิดบวกเพียง 236 ราย คิดเป็นความไวในการตรวจเพียงร้อยละ 92.9 เมื่อตรวจซีรัมชนิดลบก็ให้ผลลบเพียง 66 ราย คิดเป็นความจำเพาะเพียงร้อยละ 89.2 เท่านั้น ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบคิดเป็นร้อยละ 96.7 และ 78.6 ตามลำดับ นอกจากนี้วิธี Dot immunoassay นี้ยังมีความแปรปรวนในการอ่านผลการทดสอบมากแม้ผู้อ่านผลจะเป็นนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ผู้ชำนาญก็ตาม คณะผู้วิจัยเสนอให้ใช้วิธีนี้อย่างระมัดระวังและใช้ให้เหมาะสมกับกลุ่มตัวอย่าง และไม่ควรใช้วิธีนี้กับการตรวจคัดกรองผู้บริจาคโลหิตซึ่งต้องการวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่านี้

ABSTRACT

A dot immunoassay was evaluated for its efficacy in diagnosis of HIV-infection. 328 sera were analysed to be 254 seropositive and 74 seronegative by Western blot. Using Dot immunoassay, only 236 seropositive sera were found positive while 66 seronegative sera were negative.

Scanned by CamScanner

Therefore, this commercial kit gave sensitivity of 92.9% and specificity of 89.2% with predictive positive value and predictive negative value of 96.7% and 78.6%, respectively. Moreover, this method showed high variability of the observed data even when the results were observed by well-trained medical scientists. Finally, the researcher suggested that this method has to be carefully applied for diagnosis and selected for some risk groups. However, this method was not suitable for blood donors screening which required a higher performance of the test.

บทนำ

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสโรคเอดส์ทางห้องปฏิบัติการประกอบด้วยการตรวจคัดกรอง (screening test) และการตรวจยืนยัน (confirmatory test) ซึ่งจะตรวจภายหลังการตรวจคัดกรองให้ผลบวกแล้ว วิธีตรวจคัดกรองที่ใช้กันในปัจจุบันมีการพัฒนาหลายวิธีได้แก่ วิธีที่ใช้หลักการของเทคนิคอีไลซ่า ทั้งแบบปฏิกิริยาจับโดยตรง (Direct ELISA) และแบบแย่งจับ (Competitive ELISA) วิธีตรวจอย่างง่ายและวิธีตรวจอย่างรวดเร็ว ซึ่งการเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นกับวัตถุประสงค์และความเหมาะสมในการตรวจวินิจฉัย

วิธีอีไลซ่าเป็นวิธีที่ให้ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ที่ยอมรับได้[1] เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างส่งตรวจปริมาณมาก เพราะสามารถทดสอบครั้งละหลายตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกันแต่วิธีนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง การทดสอบมีหลายขั้นตอน ผู้ทำการทดสอบจึงต้องมีความระมัดระวังรอบคอบเป็นพิเศษ เพราะอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย[2,3]

การตรวจด้วยวิธีอีไลซ่าได้พัฒนาการเตรียมแอนติเจน โดยสมัยแรกมักจะใช้ไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกทำให้แตกสลายตัว ซึ่งมีข้อเสียคือมักเกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะกับเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นผลให้เกิดผลบวกปลอมได้สูง ต่อมาจึงเปลี่ยนเป็นการใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม และแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์สังเคราะห์ ทำให้ได้แอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ช่วยลดปัญหาการเกิดผลบวกปลอมได้ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาให้สามารถตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM สำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กซึ่งยังไม่พร้อมทั้งทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดสอบ และมีจำนวนตัวอย่างไม่มาก

การตรวจด้วยวิธีอย่างง่ายและวิธีรวดเร็วมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ วิธีตรวจอย่างง่ายที่นิยมใช้แพร่หลายได้แก่วิธี Particle agglutination ซึ่งมีความไวและความจำเพาะใกล้เคียงกับวิธีอีไลซ่า[4-6] มีขั้นตอนการทำและใช้เวลาน้อยกว่า สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ทดสอบครั้งละกี่ตัวอย่างก็ได้ และมีราคาใกล้เคียงกับวิธีอีไลซ่า ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจแบบรวดเร็วขึ้นซึ่งใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่า 30 นาที[7] ได้แก่วิธี Autologous red cell agglutination, immunocomb, membrane ELISA และ Dot immunoassay เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะที่แตกต่างกัน

คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการตรวจด้วยวิธีรวดเร็วซึ่งกำลังเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายกับห้องปฏิบัติการทั่วๆไป จึงได้ทำการศึกษาประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา Dot immunoassay ชนิดหนึ่งเปรียบเทียบกับวิธี Western blot ซึ่งถือเป็นวิธีอ้างอิง[8]

วัสดุและวิธีการ

1) ตัวอย่างตรวจ

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเป็นซีรัมที่ได้รับจากการตรวจคัดกรองจากโรงพยาบาลต่างๆที่ส่งมาเพื่อ

Scanned by CamScanner

ตรวจยืนยันการติดเชื้อ HIV ที่ฝ่ายไวรัสโรคเอดส์และไวรัสก่อมะเร็ง สถาบันวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างเดือนตุลาคม 2535 ถึง ตุลาคม 2536 ซีรัมทั้งหมดจะผ่านการ inactivate ที่ 56°C นาน 30 นาที และเก็บที่ -20°C จนกว่าจะทำการทดสอบ

การทดสอบจะทำแบบไม่ทราบผลของซีรัม (Blind technique) โดยไม่แยกว่าเป็นซีรัมที่ให้ผลบวกหรือผลลบแต่อย่างใด

2) น้ำยาที่ใช้ทดสอบ

2.1) วิธี Dot immunoassay ที่ใช้ทดสอบเป็นน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้แอนติเจนชนิดเปปไทด์สังเคราะห์ส่วน gp41 ของเชื้อ HIV-1 และ gp36 ของเชื้อ HIV-2 เคลือบบนแผ่นโพลีสไตรีน หลังจากทำปฏิกิริยากับซีรัมตรวจสอบแล้ว จะติดตามผลการการทดสอบด้วยคอนจูเกตชนิด protein A colloidal gold อ่านผลด้วยตาเปล่า ถ้าปรากฏจุดสีแดง (red spot) เกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลบวก ส่วนผลลบจะไม่ปรากฏจุดสีแดง การอ่านผลจะให้นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ผู้ชำนาญอ่านผลตรงกันอย่างน้อย 2 คน

2.2) วิธี Western blot ใช้น้ำยาสำเร็จรูป HIV Blot 2.2 ภายใต้ลิขสิทธิ์การนำเข้าของบริษัท Diagnostic Biotechnology วิธีการทดสอบตามที่กำหนดในเอกสารกำกับของบริษัทผู้ผลิตทุกประการ การแปลผลตามคำแนะนำที่แนบมาพร้อมชุดน้ำยาซึ่งอ้างอิงหลักเกณฑ์ของ American Red Cross

ผลบวก พบแถบโปรตีนในแต่ละส่วนที่กำหนดจากชิ้นส่วนยีนส์อย่างน้อยส่วนละ 1 แถบ คือ

- แถบโปรตีนจากแกนกลาง (gag) ได้แก่ p17, p24, p36 หรือ p55
- แถบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ (pol) ได้แก่ p31, p55 หรือ p66
- แถบโปรตีนเปลือกนอก (env) ได้แก่ gp160, gp120 หรือ gp41

ผลลบ ไม่พบแถบโปรตีนที่จำเพาะต่อเชื้อ HIV

ผลคลุมเครือ พบแถบโปรตีนแต่ไม่ตรงกับเกณฑ์ของผลบวก ผลคลุมเครือของวิธีนี้ไม่นำมาคิดความไว และความจำเพาะของการทดสอบ

ผลการศึกษา

ผลการตรวจหา Anti-HIV ในตัวอย่างจำนวน 328 ตัวอย่าง ทั้งวิธีWestern blot และวิธี Dot immunoassay พบว่าวิธี Western blot ให้ผลบวก 254 ราย ผลลบ 74 ราย ส่วนวิธี Dot immunoassay ให้ผลบวก 244 ราย ผลลบ 84 ราย โดยที่ทั้งสองวิธีให้ผลบวกตรงกัน 236 ราย ผลลบตรงกัน 66 ราย ในขณะที่ให้ผลบวกโดย Western blot แต่ลบโดย Dot immunoassay (นั่นคือเกิดผลลบปลอมขึ้น) จำนวน 18 ราย คิดเป็น 7.1% และให้ผลลบโดยวิธี Western blot แต่บวกโดย Dot immunoassay จำนวน 8 ราย นั่นหมายถึงเกิดผลบวกปลอม 10.8% ดังแสดงในตาราง ที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธี Dot immunoassay กับ วิธี Western blot

		Western blot		
		บวก	ลบ	รวม
Dot immunoassay	บวก	236	8	244
	ลบ	18	66	84
	รวม	254	74	328

Scanned by CamScanner

จากตารางสรุปประสิทธิภาพของวิธี Dot immunoassay ได้ดังนี้

- Sensitivity = 236/254 = 92.9%
- Specificity = 66/74 = 89.2%
- Positive predictive value = 236/244 = 96.7%
- Negative predictive value = 66/84 = 78.6%

วิจารณ์ผล

จากการประเมินประสิทธิภาพของการทดสอบด้วยวิธี dot immunoassay ชนิดนี้ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการทั่วไป รวมทั้งในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ คณะผู้วิจัยพบว่าค่าความไวเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้วิธี Western blot เป็นวิธีอ้างอิงมีค่าเท่ากับร้อยละ 92.9 ซึ่งถือเป็นค่าที่ไม่สูงนัก การที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบของการตรวจคัดกรองผู้ติดเชื้อ HIV ควรจะมีค่าความไวที่สูงกว่านี้ ค่าความจำเพาะของการทดสอบเท่ากับร้อยละ 89.2 ถือเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นวิธียืนยันผลการทดสอบของวิธีอื่น[9] ทั้งนี้เป็นผลมาจากผลลบปลอมและผลบวกปลอม ซึ่งสูงถึง 7.1%และ 10.8% ตามลำดับ อย่างไรก็ดีในการทดสอบครั้งนี้พบว่าค่าทำนายผลบวกมีค่าเท่ากับ 96.7% จึงมีความไม่แน่นอนในการรายงานผลบวกเท่ากับ 3.3% ชุดการทดสอบนี้จึงเหมาะสมที่จะใช้ตรวจหาการติดเชื้อ HIV ในบางกลุ่มตัวอย่างเท่านั้น เช่น กลุ่มที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อสูง โดยเฉพาะในกลุ่มชายหรือหญิงอาชีพพิเศษและกลุ่มผู้ติดยาเสพติดเป็นต้น ส่วนค่าทำนายผลลบ มีค่าเพียง 78.6% ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ต่ำมาก เพราะ 22.4% ของผลลบที่รายงานนั้นไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นผลลบจริงๆ

ปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นในการทดสอบวิธีนี้คือการอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่ามีความยุ่งยากพอสมควรในการที่จะตัดสินว่าผลบวกหรือผลลบในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นจุดสีแดงจางๆ หรือเกิดสีแดงเฉพาะบางส่วน ทางคณะผู้วิจัยจึงได้นำผลการทดสอบทั้งหมดไปให้นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ตามโรงพยาบาลต่างๆ ที่เคยมีประสบการณ์กับการทดสอบนี้มาแล้วจำนวน 5 ท่าน พบว่าไม่สามารถอ่านผลได้เหมือนกันดังแสดงในตารางที่ 2

จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อนำมาทดสอบเพื่อหาความแตกต่างในการอ่านผลของแต่ละบุคคลโดยใช้ Chi-square Test พบว่ามีค่า = 10.26 ที่ระดับความเชื่อมั่น

ตารางที่ 2 แสดงการอ่านผลการทดสอบของนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 5 ท่าน

ผล	A	B	C	D	E
บวก	224	225	244	249	250
ลบ	104	103	84	79	78

(หมายเหตุ การประเมินผลการอ่านไม่คำนึงว่าจะถูกต้องสอดคล้องกับวิธี Western blot แต่อย่างใด)

Scanned by CamScanner

95% (α<0.05) ซึ่งถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลเหล่านี้เป็นหลักฐานชี้ชัดว่า การอ่านผลโดยการอ่านจุดสีแดงที่เกิดขึ้นกระทำได้ยาก แสดงว่าระบบการอ่านผลการทดสอบนี้ จำเป็นต้องมีการปรับปรุงให้ดียิ่งขึ้น

อนึ่ง การทดสอบประเมินประสิทธิภาพในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ใช้กลุ่มตัวอย่างจากหลายกลุ่มที่ส่งมาจากโรงพยาบาลต่าง ๆ โดยไม่คำนึงถึงปัจจัยเสี่ยง ความชุกของการติดเชื้อและอาการทางคลีนิคของผู้ป่วย ดังนั้นจึงเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เหมาะสำหรับใช้ประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาที่ใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ติดเชื้อ HIV ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆไป

จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมาทางคณะผู้วิจัยเห็นว่าชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปวิธีนี้ยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานธนาคารเลือด เนื่องจากค่าความไว และความจำเพาะมีเพียงร้อยละ 92.9 และ 89.2 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าค่อนข้างต่ำ แต่อย่างไรก็ดีชุดน้ำยาทดสอบนี้มีข้อดี คือ ทำได้ง่ายสะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ไม่ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ช่วย และมีราคาต้อหน่วยถูก จึงอาจเหมาะสมที่จะใช้ในภาวะฉุกเฉินต้องการผลการทดสอบให้ทันเหตุการณ์ ซึ่งดีกว่าไม่ได้ทดสอบด้วยวิธีใดเลย

ชุดน้ำยาทดสอบการติดเชื้อ HIV ในปัจจุบันที่ใช้ในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นการนำเข้าจากต่างประเทศ หรือนำเข้าส่วนประกอบต่าง ๆมาเตรียมเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปภายในประเทศยังไม่มีการควบคุมคุณภาพให้ได้มาตรฐานก่อนการนำออกจำหน่าย ทำให้ผู้ใช้ไม่มีแหล่งข้อมูลที่แท้จริงในการที่จะตัดสินใจเลือกใช้ ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขไม่ได้ละเลยสำหรับปัญหาเช่นนี้ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาโดยความร่วมมือกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมควบคุมโรคติดต่อ สภากาชาดไทย และทบวงมหาวิทยาลัยกำลังดำเนินการจัดทำระบบประกันคุณภาพของน้ำยาที่ใช้ทดสอบการติดเชื้อ HIV ขึ้น เพื่อให้ผู้ใช้ได้เกิดความมั่นใจที่จะเลือกใช้น้ำยาสำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV ให้เหมาะกับวัตถุประสงค์และความชุกของการติดเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 5 ท่าน ที่ได้ให้ความร่วมมือในการอ่านผลการทดสอบด้วยความตั้งใจอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

1. Reesink HW, Lelie PN, Huisman JG. Evaluation six enzyme immunoassay for antibody against human immunodeficiency virus. Lancet 1986;2:483-6.
2. Schwartz JS, Dans PE, Kinosian BP. Human immunodeficiency virus test evaluation, performance and use, proposal to make good test better. JAMA 1988;259:2574-2579.
3. Courouce AM. Evaluation of eight ELISA kits for the detection of anti LAV/HTLV III antibodies. Lancet 1986;2:1152-1153.
4. Yoshida T, Matsui T, Kobayashi S, Yamamoto N. A novel agglutination test for the human immunodeficiency virus antibody: a comparative study with enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence. Jpn Cancer Res. 1986;77:1211-1213.

Scanned by CamScanner

5. Yoshida T, Matsui, T Kobayashi S, Yamamoto N. Evaluation of passive agglutination test for antibody to human immunodeficiency virus. J Clin Microb 1987;25:1433-1437.
6. Mitchell SW, M' Boup S, Mingle J, et al. Field evaluation of alternative HIV testing strategies with a rapid immunobinding assay and an agglutination assay. Lancet 1991,337:1328-1330.
7. H. tamashiro, W Maskill, T Emmanuel, A Fauquex, P Sato D Heymann. Reducing the cost of HIV antibody testing. The lancet 1993;342:87-89.
8. Constantive NT, Callahan JD, Watts DM. HIV testing and quality control, a guide for laboratory personnel. North Corolina USA. 1991.
9. ห้องปฏิบัติการศูนย์ความร่วมมือการวิจัยโรคเอดส์. การเฝ้าระวังโรค. จาก: World Health Organization. Global Program on AIDS - recommendation for the selection and use of HIV antibody test. Wkly Epidemiology Record 1992;67:145-149.

Scanned by CamScanner