วิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์และวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟฟีสำหรับการตรวจคัดกรองภาวะเลือดออกในทางเดินอาหาร

The Latex Agglutination Immunoassay and Immunochromatography Method for the Screening of Gastrointestinal Bleeding Disorder

กฤษฎา ศิริสภาภรณ์*, สุภาพร พุ่มพา และพลากร พุทธรักษ์

งานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Kridsada Sirisabhabhorn*, Supaporn Pumpa and Palakorn Puttaruk

Department of Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

วิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์เป็นหลักการตรวจคัดกรองภาวะเลือดออกในทางเดินอาหาร รายงานผลเป็นปริมาณฮีโมโกลบิน ซึ่งจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเพื่อใช้ตัดสินผลบวกและลบแตกต่างกับหลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟฟี (IC) ที่สังเกตผลจากแถบสีที่ปรากฏในชุดทดสอบ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของฮีโมโกลบินในอุจจาระสำหรับการตัดสินผลบวกและลบของหลักการลาแทกซ์-แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์โดยเปรียบเทียบกับหลักการ IC โดยศึกษาจากอุจจาระผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 116 ราย ใช้กราฟอาร์โอซีเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่เหมาะสมและสถิติไคสแควร์ศึกษาความสัมพันธ์กับวิธี IC จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่เหมาะสม คือ 41 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องของการจำแนกร้อยละ 95.45, 72.00 และ 85.34 ตามลำดับ และแสดงอำนาจการจำแนกร้อยละ 91.91 ภายใต้ความเชื่อมั่นร้อยละ 87.00 ถึง 97.00 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ดีมาก สรุปว่าการศึกษาครั้งนี้ ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่ 41 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ของวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ให้ค่าความไวมากที่สุดและความจำเพาะที่ดีในระดับการตรวจคัดกรองเมื่อเทียบกับวิธี IC มากที่สุด แม้ว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะไม่มีความสัมพันธ์กับวิธี IC แต่ปริมาณเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยระหว่างผลบวกและผลลบของวิธี IC มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ควรต้องศึกษาร่วมกับปัจจัยอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองต่อไป

คำสำคัญ : แอกกลูติเนชัน; อิมมูโนแอสเสย์; อิมมูโนโครมาโตกราฟฟี; ภาวะเลือดออก; ทางเดินอาหาร

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** kridsada.research1@gmail.com

Abstract

The latex agglutination immunoassay is a diagnostic technique for the determination of gastrointestinal bleeding disorder through the investigation of hemoglobin (Hb) concentration (conc.). This differs from the immunochromatography (IC) method which requires the observation of band patterns on a test pad to determine negative or positive results. The research objective is to investigate suitable Hb conc. in fecal samples to indicate positive and negative results in latex agglutination immunoassay through the comparison of results with the IC method. The study was conducted using 116 fecal specimens from patients who attended Thammasat University Hospital, Pathum Thani province. ROC curve and Chi-square test were used to explore the appropriate Hb conc. and association analysis with IC method. The result illustrated the most appropriate cut-off of Hb conc. at 41 nanogram per milliliter (ng/ml) which provided percent of sensitivity, specificity and correctly classified are 95.45, 72.00 and 85.34 % respectively. Moreover, this Hb conc. provides power of discrimination of 91.91, within confidence interval of 87.00 to 97.00 %. These results can be considered as outstanding. In conclusion, the study revealed that the cut-off Hb. conc. at 41 ng/mL in latex agglutination immunoassay provides the best percentage of sensitivity and good specificity when compared with IC method. Although, erythrocyte count by light microscope is not related to IC method, average count is significantly different between positive and negative results in IC method. The aim of future research should be to evaluate latex agglutination immunoassay combined with other factors in order to improve efficiency of screening diseases.

Keywords: agglutination; immunoassay; immunchromatography; bleeding; gastrointestinal tract

1. บทนำ

การตรวจหาเลือดในอุจจาระ (fecal occult blood, FOB) เป็นการตรวจที่มีความสำคัญบ่งบอกถึงภาวะเลือดออกในทางเดินอาหาร (gastrointestinal bleeding) มีสาเหตุจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น โรคริดสีดวงทวาร โรคติดเชื้อจุลชีพ เช่น แบคทีเรีย ปรสิต การอักเสบ การบาดเจ็บ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งมีความสามารถตรวจจับโรคมะเร็งลำไส้ (colorectal cancer, CRC) ได้อย่างจำเพาะสูงถึงร้อยละ 87-98 [1] ปัจจุบันพบว่าโรคมะเร็งลำไส้มีอัตราการเสียชีวิต 700,000 คนต่อปี ซึ่งสูงเป็นอันดับสองในกลุ่มโรคมะเร็ง [2] รองจากโรคมะเร็งเต้านม (breast cancer) [3] สำหรับประเทศในแถบทวีปเอเชียพบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งลำไส้สูงถึงร้อยละ 15-20 ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาและมีแนวโน้มสูงขึ้นในประเทศไทย [4] มีรายงานการศึกษาว่าโรคมะเร็งลำไส้สามารถป้องกันได้โดยการตรวจคัดกรอง (screening test) ช่วยลดการเสียชีวิตได้ถึงร้อยละ 10-21 [5] ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์โดยทั่วไปนิยมตรวจ FOB โดยใช้หลักการทางเคมี เช่น Guaiac-Based Fecal Occult-Blood Test (gFOBT) และอิมมูโนโครมาโตกราฟฟี (immunochromatography, IC) วิธี g-FOBT อ่านผลบวกจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างโมเลกุลของออกซิเจนของฮีโมโกลบิน (hemoglobin, Hb) ในเม็ดเลือดแดงกับ

tetramethylbenzidine (TMB) ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ที่มีสีจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีฟ้าอมเขียวในชุดทดสอบ และต้องอ่านผลภายใน 2 นาที [6] โดยมีความไว (sensitivity) ประมาณร้อยละ 25-38 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 16-31 สำหรับการตรวจจับมะเร็งลำไส้ชนิด advanced adenomas [7] แต่สามารถให้ผลบวกลวง (false positive) มากจากการรับประทานอาหารและยาบางชนิด [8-10] ส่วนวิธี IC จะตรวจจับแอนติเจน (antigen, Ag) ของเม็ดเลือดแดงเฉพาะของมนุษย์ (specific human erythrocyte) มีความไวและความจำเพาะประมาณร้อยละ 76-95 กับโรค CRC ซึ่งสูงกว่าหลักการ gFOBT [8,11,12] และมีรายงานการศึกษาในประเทศไทยว่าวิธี IC มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบในการตรวจจับโรค CRC เท่ากับร้อยละ 91.00, 93.80, 95.80 และ 87.00 ตามลำดับ [11] จึงเป็นที่นิยมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ประจำวัน นอกจากนี้หลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ (lalex agglutination immunoassay) เป็นเทคโนโลยีใหม่รายงานผลเป็นปริมาณ (quantitative) ของฮีโมโกลบินในอุจจาระโดยตัดสินผลบวก (positive) และผลลบ (negative) จากค่า cut-off ที่กำหนดและมีรายงานการศึกษาจำนวนมากในประเทศแถบทวีปยุโรปและทวีปเอเชีย โดยแตกต่างกันในแต่ละลักษณะของประชากรของแต่ละประเทศ [11,14] แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย

การตรวจคัดกรองโดยวิธีอิมมูโนแอสเสย์ได้รับการยอมรับจาก World Endoscopy Organization (WEO) และ Expert Working Party (EWP) เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองโรค CRC [8] ซึ่งมี 2 ประเภท คือ ประเภทแรกจะบ่งบอกผลบวกและลบจากเส้นปฏิกิริยาจากแถบทดสอบ (test line) และแถบควบคุม (control line) ตามที่ปรากฏเรียกว่า qualitative I-FOBT หรือวิธี IC ทำให้มีความมั่นใจในการอ่านผล ประเภทที่สองจะรายงานผลเป็นปริมาณความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (hemoglobin, Hb) เป็นหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ng/mL) เรียกว่า quantitative I-FOBT เช่น หลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยใช้ค่า cut-off ตัดสินผลบวกและผลลบ [2] เพื่อให้ได้ค่าที่มีความไวและความจำเพาะอย่างเหมาะสม [15] โดยส่วนใหญ่จะศึกษาหาค่า cut-off จากการเปรียบเทียบปริมาณของ Hb จากเครื่องตรวจวิเคราะห์กับผลตรวจทางพยาธิวิทยาและวิธีการส่องกล้อง (colonoscopy) ซึ่งอาจพบความผิดพลาดได้ถึงร้อยละ 30 กับลักษณะอาการของผู้ป่วยในระยะต่าง ๆ ของโรคมะเร็งลำไส้ [16] จากการศึกษาของ Droste และคณะ ได้รายงานความไวต่อการตรวจจับโรค CRC ในระยะเริ่มต้นของหลักการนี้ได้ร้อยละ 78.90 ถึง 84.20 [17] แต่วิธีนี้ผู้ตรวจวิเคราะห์อาจไม่มั่นใจเนื่องจากไม่แสดงแถบสีเพื่ออ่านผล อย่างไรก็ตาม พบว่าหากค่า cut-off ระดับต่ำสุดของหลักการนี้มีค่าสูงกว่าหลักการ IC อาจทำให้เกิดผลลบลวง (false negative) ซึ่งอาจทำให้พลาดการวินิจฉัยในโรคอื่นที่ไม่ใช่โรคมะเร็งลำไส้ได้ อีกทั้งการศึกษาวิเคราะห์ FOB เปรียบเทียบระหว่างหลักการ IC และหลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ ในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย และหากจะนำมาใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ประจำวันจำเป็นต้องศึกษาวิเคราะห์และประเมินผลเปรียบเทียบกับวิธี IC ซึ่งเป็นหลักการดั้งเดิมจะช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ FOB ของหลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์กับวิธี IC ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่ของห้องปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์สำหรับนำมาประยุกต์ใช้งานของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต่อไป

2. วิธีการศึกษา

2.1 กลุ่มตัวอย่าง

คัดเลือกอุจจาระของผู้ป่วยหลังการตรวจวิเคราะห์ของงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี โดยสุ่มเลือกอุจจาระที่ให้ผลบวกและลบโดยวิธี IC จำนวนอย่างละเท่า ๆ กัน [18] โดยคำนวณจำนวนตัวอย่างทั้งหมดจากสูตร $N = 1.96^2\pi(1-\pi)/\delta^2$ [19] โดย π คือ ความไวจากการศึกษาครั้งก่อนและ δ คือ ผลที่คาดว่าจะแตกต่างในการศึกษาในครั้งนี้ โดยกำหนดความสัมพันธ์แอลฟ่า (α) เท่ากับ 0.05 และอำนาจการทดสอบ (power of test) เท่ากับร้อยละ 80 เมื่อคำนวณจำนวนตัวอย่างจะได้จำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 62 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่าที่คำนวณได้ คือ 116 ตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากได้รับอนุเคราะห์ชุดทดสอบจำนวน 116 ชุด และจะทำให้ผลการทดลองมีความน่าเชื่อถือมากขึ้นและเหมาะสมกับคำแนะนำของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) และ Linnet ในปี ค.ศ. 1999 [20] จากนั้นทดสอบโดยวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ ณ อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ของงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานี และงานวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ชุดที่ 2 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ หนังสือรับรองเลขที่ 063/2559

2.2 การตรวจวิเคราะห์ FOB

2.2.1 หลักการ IC (FOB Rapydtest®, Berkshire, UK) [21]

หากปริมาณ human hemoglobin (hHb) ที่ทำให้ละลายใน buffer 0.1 % NaN_3 ในชุดทดสอบตั้งแต่ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป จะจับกับ monoclonal anti-hHb antibody ที่ conjugate ด้วย colloidal gold เกิดเป็น complex และเคลื่อนที่ไปยังบริเวณ T band ที่ pre-coat ด้วย monoclonal anti-hHb antibody จนเกิด complex เป็นสีม่วงอมชมพู และจะเคลื่อนที่ไปจับกับ goat anti-mouse IgG antibody ที่บริเวณ C band จนเกิดสีม่วงอมชมพู แต่หากไม่มี hHb หรือมีปริมาณ hHb น้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร monoclonal anti-hHb Ab-conjugate จะเคลื่อนที่ไปจับกับ goat anti-mouse IgG antibody ที่บริเวณ C band จนเกิดสีม่วงอมชมพู แสดงถึงคุณภาพของชุดทดสอบ

2.2.2 หลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชัน-อิมมูโนแอสเสย์ โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ OC-Sensor: DIANA (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) [22]

โดยเม็ด polystyrene latex จะถูก sensitize ให้จับกับ anti-human HbA_0 antibody ในน้ำยาและจะทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกันอย่างจำเพาะกับ Hb ของเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ในอุจจาระแล้วเกิดความขุ่นเป็นสัดส่วนแปรผันตรงกับปริมาณ Hb ต่อหน่วยเวลา จากนั้นเครื่องจะคำนวณความเข้มข้นของ Hb จาก calibration curve ต่อไป โดยก่อนการตรวจวิเคราะห์ต้องสอบเทียบเครื่องตรวจวิเคราะห์ (calibration) โดยน้ำยาสอบเทียบ (OC-Calibrator 2 kit, Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) ความเข้มข้นสูงสุด 1,000 ng/mL เจือจางความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 1,000, 500, 200, 50, 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเครื่องจะคำนวณกราฟสอบเทียบ (calibration curve) เพื่อใช้หาความเข้มข้นของ Hb ในตัวอย่างอุจจาระต่อไปและมีการควบคุมคุณภาพประจำวัน (internal quality control, IQC) โดยสารควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ

2.2.3 การตรวจหาเม็ดเลือดแดงในอุจจาระโดยวิธีดูสดด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope

เสมียร์อุจจาระในสารละลาย 0.85 % normal saline (0.85 % NSS) ที่หยดบนสไลด์แก้ว 1 หยด ปิด cover slip นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์นับจำนวนเม็ดเลือดแดงด้วยกำลังขยาย 400 เท่า จำนวน 10 ฟิลด์ จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ของปริมาณเม็ดเลือดแดงต่อฟิลด์ (per high power field, /HPF)

2.3 การวิเคราะห์ผล [23]

ใช้กราฟอาร์โอซี (ROC curve) และพื้นที่ใต้กราฟ ROC จากโปรแกรมสำเร็จรูป Stata® version 13 เพื่อพิจารณาหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของหลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์เปรียบเทียบกับหลักการ IC และใช้การทดสอบไคส-แควร์ (χ^2) สำหรับการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างหลักการ IC กับหลักการลาแทกซ์แอกกลู-ติเนชันอิมมูโนแอสเสย์โดยกำหนดความสัมพันธ์แอลฟ่า (α) เท่ากับ 0.05 และอำนาจการทดสอบ (power of test) เท่ากับร้อยละ 80

3. ผลการวิจัย

3.1 จำนวนผลบวกและลบจากการตรวจโดยวิธี IC

ตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดที่นำมาทดลองจำนวน 116 ตัวอย่าง (n = 116) จำแนกตามผลบวกและลบจากการทดสอบโดยหลักการ IC ได้ผลตามตารางที่ 1

การตรวจ FOB ของอุจจาระทั้งหมดโดยวิธี IC พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลลบและผลบวกจำนวน 50 และ 66 รายคิดเป็นร้อยละ 43.10 และ 56.90 ตามลำดับ จากนั้นนำอุจจาระทั้งหมดมาตรวจด้วยวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์เพื่อหาจุด cut-off ของความเข้มข้นของ Hb ที่เหมาะสมได้ผลดังข้อ 3.2

ตารางที่ 1 ผลตรวจ FOB ของตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด (N = 116) จากหลักการ IC

ผลการตรวจ	$n_{ผล}/N_{ทั้งหมด}$ (%)
ผลลบ (negative)	50/116 (43.10)
ผลบวก (positive)	66/116 (56.90)
รวม	116/116 (100)

3.2 การทดสอบหาค่า cut-off ความเข้มข้นของ Hb (ng/mL) สำหรับวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของ Hb ที่เหมาะสมของวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ โดยเปรียบเทียบกับวิธี IC เพื่อหาค่า cut-off บนกราฟ ROC พบว่ามีจุดตัด (cut-off point) บนกราฟ ROC จำนวน 3 จุด ที่น่าสนใจ เนื่องจากให้ค่าความถูกต้องของการจำแนกสูงสุดร้อยละ 85.34 และแสดงความไว ความจำเพาะ positive likelihood ration และ negative likelihood ratio ดังตางรางที่ 2

ตารางที่ 2 จุดตัดทั้ง 3 จะให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC (area under ROC curve, AuROC) เท่ากับ 0.9191 โดยแสดงอำนาจการจำแนก (discriminative power) ได้ร้อยละ 91.91ภายใต้ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95 % CI) ที่ร้อยละ 87-97 ดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 จุดตัดทั้ง 3 ค่าบนกราฟ ROC จะแสดงพื้นที่ใต้กราฟ (AuROC) ประมาณเท่ากับ 0.9191 ซึ่งเทียบระดับอำนาจการจำแนกอยู่ในเกณฑ์ out-standing ตามตารางที่ 3

จากนั้นทดลองใช้ค่า cut-off ของความเข้มข้น Hb จำนวน 3 ค่า ได้แก่ 41, 57 และ 76 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กับวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชัน-

ตารางที่ 2 ค่าความไวและความจำเพาะของจุด cut-off ของความเข้มข้น Hb จำนวน 3 จุด ที่น่าสนใจจากกราฟ ROC

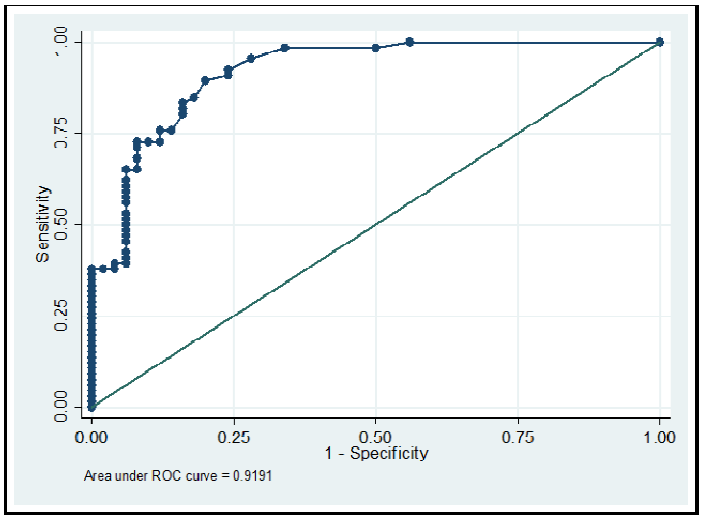
ลำดับ	จุดตัดความเข้มข้น [cut off (ng/mL)]	% ความไว (sensitivity)	% ความจำเพาะ (specificity)	Positive likelihood ratio (LR+)	Negative likelihood ratio (LR-)	% ค่าความถูกต้องของการจำแนก (correctly classified)
1	41	95.45	72.0	3.41	0.06	85.34
2	57	92.42	76.0	3.85	0.10	85.34
3	76	89.39	80.0	4.47	0.13	85.34

ตารางที่ 3 เกณฑ์แสดงระดับอำนาจการจำแนกโดยพิจารณาจากค่า AuROC [23]

ลำดับ	ค่า AuROC	อำนาจการจำแนก (discriminative power)
1	0.5	minimum (no discriminative power)
2	0.7-0.8	acceptable
3	0.8-0.9	excellent
4	>0.9	out-standing
5	1.0	maximum (perfect discriminative power)

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของการทดสอบระหว่างวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ ณ จุด cut-off ที่ 41, 57 และ 76 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กับวิธี IC

ลำดับ	วิธีการทดสอบ (N = 116)					p-value
	วิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์		วิธี IC; $n_{ผล}/N_{ทั้งหมด}$ (%)		รวม	
	จุด cut-off ความเข้มข้น (ng/mL)		ผลลบ (negative)	ผลบวก (positive)		
1	41	ผลลบ (negative)	47/50 (94.00)	25/66 (37.88)	72/116 (62.07)	<0.001
		ผลบวก (positive)	3/50 (6.00)	41/66 (62.12)	44/116 (37.93)	
		รวม	50/50 (100.00)	66/66 (100.00)	116/116 (100.00)	
2	57	ผลลบ (negative)	47/50 (94.00)	31/66 (46.97)	78/116 (67.24)	<0.001
		ผลบวก (positive)	3/50 (6.00)	35/66 (53.03)	38/116 (32.76)	
		รวม	50/50 (100.00)	66/66 (100.00)	116/116 (100.00)	
3	76	ผลลบ (negative)	47/50 (94.00)	33/66 (50.00)	80/116 (68.97)	<0.001
		ผลบวก (positive)	3/50 (6.00)	33/66 (50.00)	36/116 (31.03)	
		รวม	50/50 (100.00)	66/66 (100.00)	116/116 (100.00)	



รูปที่ 1 กราฟ ROC และพื้นที่ใต้กราฟ (area under ROC curve, AuROC) เพื่อหา cut-off ที่เหมาะสมสำหรับลาแทกซ์-แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของช่วงปริมาณเม็ดเลือดแดงและปริมาณเม็ดเลือดแดงโดยรวมเฉลี่ยของในอุจจาระจากการตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กับวิธี IC

วิธีดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์	วิธี IC; $n_{ผล}/N_{ทั้งหมด}$ (%)		p-value
ช่วงการรายงานเม็ดเลือดแดงโดยสังเขป (cells/HPF)	ผลลบ (N = 50)	ผลบวก (N = 66)	
0-1	49/50 (98.00)	55/66 (83.33)	0.061
1-2	1/50 (2.00)	6/66 (9.09)	
3-5	0/50 (0.00)	1/66 (1.52)	
5-10	0/50 (0.00)	4/4 (6.06)	
รวม	50/50 (100.00)	66/66 (100.00)	
ค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดแดง จากวิธีการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (cells/HPF)	$N_{ทั้งหมด}$ = 116		p-value
	ผลลบ (N = 50)	ผลบวก (N = 66)	
Mean ± S.D. (95 % CI)	0.06±0.11 (0.03-0.09)	0.79±2.08 (0.28-1.30)	0.01

อิมมูโนแอสเสย์ และศึกษาความสัมพันธ์เปรียบ เทียบกับวิธี IC โดยการทดสอบไคสแควร์แสดงผลตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 พบว่าหากนำค่า cut-off ที่ 41, 57 และ 76 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดลองตัดสินผลบวกและผลลบ พบว่าทั้ง 3 ความเข้มข้น มีความสัมพันธ์กับวิธี IC ทั้งผลบวกและผลลบอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาความสัมพันธ์ของการพบปริมาณเม็ดเลือดแดงในอุจจาระโดยตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กับวิธี IC ซึ่งแสดงผลตามตารางที่ 5 ในข้อ 3.3

3.3 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของวิธี IC กับปริมาณเม็ดเลือดแดงในอุจจาระโดยวิธีตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 5 พบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ตรวจนับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่สัมพันธ์กับวิธี IC โดยช่วงจำนวนเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 0-1 cell/HPF ทั้งตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบกับวิธี IC ร้อยละ 83.33 และ 98.00 ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นเพราะเม็ดเลือดแดงมีการแตก (red blood cell lysis) จากกระบวนการเตรียมอุจจาระเพื่อส่องกล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตาม พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงโดยรวมเฉลี่ยจากการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของทั้งผลบวกและลบกับวิธี IC มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

4. วิจารณ์

การทดสอบหาค่า cut-off ของความเข้มข้นของ Hb ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ FOB โดยหลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ โดยใช้ ROC curve เปรียบเทียบกับวิธี IC ซึ่งใช้ในปัจจุบันซึ่งนิยมใช้สำหรับการตรวจคัดกรองในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วไปนำมาใช้เป็นวิธีอ้างอิงในการศึกษานี้ และมีรายงานการศึกษาว่าวิธี IC มีความสัมพันธ์ในการบ่งชี้โรค CRC [24] จากการศึกษานี้พบค่า cut-off ของวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ ที่น่าสนใจ 3 ค่า ได้แก่ 41, 57 และ 76 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากให้ค่าร้อยละความถูกต้องของการจำแนกสูงสุดเท่ากับร้อยละ 85.34 แต่แสดงความไวและความจำเพาะต่างกันตามตารางที่ 2 อย่างไรก็ตาม ค่า cut-off ทั้ง 3 ค่าให้อำนาจการจำแนก (discriminative power) อยู่ในระดับ out standing หรือระดับดีมาก โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟ AuROC [23] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Droste และคณะ ที่รายงานว่าค่า cut-off $\geq$ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียง 41 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแสดงอำนาจการจำแนกสูงเท่ากับ 0.93 (95 % CI, 0.89-0.96) [17] จากการศึกษานี้พบว่าค่า cut-off ที่ 41 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าความไวสูงสุดเท่ากับร้อยละ 95.45 ความจำเพาะร้อยละ 72.00 เมื่อเทียบกับวิธี IC และแสดงอำนาจการจำแนกเท่ากับร้อยละ 91.91 นอกจากนี้ค่า cut-off ที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์ของหลักการ IC มีระดับความเข้มข้นของ Hb เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหากใช้ cut-off ของหลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์ที่สูงกว่าหลักการ IC อาจทำให้พลาดการรายงานผลบวกได้จึงควรเลือกค่า cut-off ที่ให้ค่าความไวสูงเพื่อคัดเข้าผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงกับโรค CRC มากที่สุดก่อนจะตรวจยืนยันต่อไป ดังนั้นจึงพิจารณาเลือก cut-off ที่ระดับความเข้มข้นที่ 41 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่หากต้องการความจำเพาะที่สูงขึ้นสามารถเลือกใช้ค่า cut-off ที่สูงขึ้นได้ เคยมีรายงานการศึกษาของ Sovich และคณะ พบว่าระดับค่า cut-off ของ Hb ช่วงความเข้มข้น 20-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความไวในการตรวจจับโรค CRC ได้สูงถึงร้อยละ 66-88 [14] และจากการศึกษาของ Sobhani และคณะ พบว่าค่า cut-off ที่ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความคุ้มค่าและประสิทธิภาพในกลุ่มประชากรกลุ่มเสี่ยง [25] อย่างไรก็ตาม ทั้งวิธี IC และวิธีลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโน-แอสเสย์เป็นวิธีตรวจในระดับคัดกรองที่ไม่จำเพาะต่อโรค CRC เพียงอย่างเดียวแต่ยังให้ผลบวกกับโรคหรือภาวะเลือดออกในทางเดินอาหารหลายชนิด เช่น diverticulitis, colitis, polyps [26-28] จากการศึกษาของ Faivre และคณะ พบว่ามีการรายงานผลค่า cut-off ของความเข้มข้นของ Hb ที่ระดับต่างกันของหลักการนี้ตั้งแต่ 20, 50, 75, 100, 150 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรโดยขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการนำไปใช้ [29] เคยมีรายงานการศึกษาค่า cut-off ของความเข้มข้นของ Hb ที่ระดับมีความสัมพันธ์กับโรค CRC อย่างมีนัยสำคัญ เช่น การศึกษาของ Vilkin และ

คณะ รายงานว่าปริมาณของ Hb มากกว่า 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่นิยมใช้กันส่วนใหญ่จะสามารถตรวจจับมะเร็งชนิด advanced adenomas ได้และมีความไวในการตรวจจับโรค CRC ได้ร้อยละ 60-82 [30] และความไวจะลดลงแต่ความจำเพาะต่อ CRC จะเพิ่มขึ้นเมื่อปรับค่า cut-off เพิ่มขึ้น [31] ซึ่งหากนำมาใช้เพื่อการตรวจคัดกรองควรใช้ค่า cut off ในระดับน้อย แต่หากนำไปใช้เพื่อคัดเข้าให้ใกล้เคียงกับวิธีการตรวจมาตรฐานของโรค CRC มากที่สุด เพื่อลดภาระค่าใช้จ่ายในการตรวจยืนยันควรเลือกใช้ค่า cut-off ที่มีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตาม ควรพิจารณาจุด cut-off ที่ให้ค่าความไวและความจำเพาะใกล้เคียงกัน [32] จากการศึกษาของ McDonald และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 และ Turenhout และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 พบว่าอายุ เพศ และลักษณะของประชากรในแต่ละพื้นที่มีผลทำให้ค่า cut-off แตกต่างกัน [11,33, 34] ดังนั้นจึงควรศึกษาและพิจารณากำหนดค่า cut-off ใช้เอง โดยขึ้นกับวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันและปัจจัยด้านลักษณะของประชากรที่แตกต่างกันของแต่ละพื้นที่ ดังนั้นการศึกษาหาค่า cut-off ใหม่จึงต้องนำข้อมูลหลายชนิดที่คิดว่ามีผลต่อค่า cut-off เช่น เพศ อายุ และผลการตรวจส่องกล้องมาประกอบการพิจารณา เช่น Stegeman และคณะ เคยศึกษาการประยุกต์ IFOBT ร่วมกับปัจจัยหลายชนิด เช่น เพศ อายุ ประวัติทางครอบครัว และดัชนีมวลกาย สามารถนำมาประเมินความเสี่ยงการเกิดโรค CRC ได้ดีขึ้น [35] และมีรายงานว่าหลักการเชิงปริมาณเหมาะสมกับการตรวจติดตามผลการรักษา ติดตามระยะการดำเนินของโรคและการตรวจเพื่อดูแลสุขภาพแบบ point-of-care tests (POCTs) [8] นอกจากนี้ควรคำนึงถึงปัจจัยด้านเศรษฐศาสตร์ เช่น ภาวะการเงินขององค์กร สภาพทางเศรษฐกิจของของประชากรในพื้นที่ ปริมาณและภาระงานที่จะนำเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติมาใช้ รวมทั้งยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อปริมาณ Hb ในอุจจาระลดลง ทำให้ค่า cut-off ที่ได้อาจลดลงไปด้วย เช่น รายงานของ Guittet และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 และ van Roon และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 รายงานว่าระยะเวลา อุณหภูมิ ตามฤดูกาล และวิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจมีผลทำให้ปริมาณ Hb ในอุจจาระลดลง [36-38] ในการศึกษานี้พบว่าช่วงปริมาณเม็ดเลือดแดงในอุจจาระส่วนใหญ่อยู่ในช่วงน้อยมาก (0-1 cell/HPF) อาจเป็นเพราะเม็ดเลือดแดงมีการแตก แต่จำนวนเม็ดเลือดแดงโดยรวมเฉลี่ยของผลบวกและผลลบจากวิธี IC ยังคงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม การตรวจหาเลือดในอุจจาระยังคงเป็นที่นิยมสำหรับการตรวจคัดกรองการตรวจมะเร็งลำไส้ เนื่องจากไม่ต้องเก็บสิ่งตรวจที่จะทำให้ผู้ป่วยรู้สึกเจ็บปวด เช่น วิธีส่องกล้องหรือตรวจชิ้นเนื้อ มีราคาถูก ขั้นตอนการทดสอบง่ายสะดวก ทราบผลได้รวดเร็ว และสามารถนำไปตรวจในภาคสนามได้

5. สรุป

การตรวจหาเลือดในอุจจาระด้วยหลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนเอสเสย์เป็นวิธีใหม่ที่รายงานปริมาณ Hb หน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิจัยนี้ได้พิจารณาจุด cut-off ของความเข้มข้นของ Hb ที่ 41 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะจะให้ค่าความไวมากที่สุดและความจำเพาะที่ดีในระดับการตรวจคัดกรองเมื่อเทียบกับวิธี IC สามารถนำค่า cut-off มาใช้ตัดสินผลบวกและผลลบช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานมีความเชื่อมั่นใจในการรายงานยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ควรต้องพัฒนาการตรวจคัดกรองโรค CRC ของหลักการลาแทกซ์แอกกลูติเนชันอิมมูโนแอสเสย์เปรียบเทียบกับวิธีส่องกล้องและตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยพิจารณาร่วมกับปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลกระทบต่อค่า cut-off เพื่อให้มีความจำเพาะต่อโรค

และระยะของโรคมากขึ้นซึ่งจะช่วยการวินิจฉัยโรค CRC ของแพทย์ให้ดียิ่งขึ้น

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท เมดวัน ประเทศไทย จำกัด ที่อนุเคราะห์ผลิตภัณฑ์มาใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอยืนยันว่างานวิจัยนี้ไม่มีผลประโยชน์และส่วนได้ส่วนเสียใดแอบแฝงในเชิงธุรกิจ เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาความรู้ทางวิชาการเป็นแนวทางนำมาประยุกต์ใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ประจำวันเท่านั้น

7. รายการอ้างอิง

[1] Levi, Z., Rozen P. and Hazazi, R., 2007, A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia, Ann. Int. Med. 146: 244-255.

[2] Daly, J.M., Bay, C.P. and Levy, B.T., 2013, Evaluation of fecal Immunochemical tests for CRC screening, J. Prim Care Commun. Health 4: 1-4

[3] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, Int. J. Cancer 136: E359-386.

[4] Khuhaprema, T. and Srivatanakul, P., 2008, Colon and rectum cancer in Thailand: An overview, Jpn. J. Clin. Oncol. 38: 237-243.

[5] Massat, N.J., Moss, S.M. and Halloran, S.P., 2013, Screening and primary prevention of colorectal cancer: A review of sex-specific and site-specific differences, J. Med. Screen. 20: 125-148.

[6] Lohsiriwat, V., 2014, Accuracy of self-checked fecal occult blood testing for colorectal cancer in Thai patients, APJCP. 15: 7981-7984.

[7] Whitlock, E.P., Lin J.S., Liles, E., Beil, T.L. and Fu, R., 2008, Screening for colorectal cancer: A targeted, up dated systematic review for the U.S. preventive services Task Force, Ann. Int. Med. 149: 638-658.

[8] Allison, J.E., Fraser, C.G., Halloran, S.P. and Young, G.P., 2014, Population screening for colorectal cancer means getting FIT: The past, present, and future of colorectal cancer screening using the fecal immunochemical test for hemoglobin (FIT), Gut Liver 8: 117-130.

[9] Macrae, F.A. and St John, D.J., 1982, Relationship between patterns of bleeding and hemoccult sensitivity in patients with colorectal cancers or adenomas, Gastroenterology 82: 891-898.

[10] Hernandez, V., Cubiella, J., Gonzalez-Mao, M.C., *et al*., 2014, COLONPREV study investigators fecal immunochemical test accuracy in average-risk colorectal cancer screening, World J. Gastroenterol. 20: 1038-1047.

[11] Stracci, F., Zorzi, M. and Grazzini G., 2014, Colorectal cancer screening: Tests,

strategies, and perspectives, Front. Public Health 2: 210.

[12] Quintero, E., Castells, A., Bujanda, L., *et al*., 2012, Colonoscopy versus fecal immune-chemical testing incolorectal-cancer screening, N. Engl. J. Med. 366: 697-706.

[13] Lohsiriwat, V., Thavichaigarn, P. and Awapittaya, B.A., 2007, Multicenter prospective study of immunochemical fecal occult blood testing for colorectal cancer detection, J. Med. Assoc. Thai 90: 2291-2295.

[14] Sovich, J.L., Sartor, Z. and Misra, S., 2015, Developments in screening tests and strategies for colorectal cancer, Biomed. Res. Int. Article ID 326728, 11 p.

[15] Lieberman, D.A., 2009, Clinical practice: Screening for colorectal cancer, N. Engl. J. Med. 361: 1179-1187.

[16] Pullens, H.J. and Siersema, P.D., 2014, Quality indicators for colonoscopy: Current insights and caveats, World. J. Gastrointest Endosc. 6: 571-583.

[17] Droste, J.S.T., Oort F.A., Hulst, R.W.M.V.D., *et al*., 2011, Higher fecal immunochemical test cut off levels: Lower positivity rates but still acceptable detection rates for early-stage colorectal cancers, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 20: 272-280.

[18] Hajian-Tilaki, K., 2014, Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics, J. Biomed. Inform. 48: 193-204.

[19] Yamane, T., 1973, Statistics: An Introductory Analysis, John Weather Hill, Inc., London.

[20] National Committee for Clinical Laboratory Standards, Method comparison and bias estimation using patient samples, 1995, Approved guideline, NCCLS document EP9-A, Villanova, PA, NCCLS. 15: 1-36.

[21] Instruction for use: Fecal occult blood Rapydtest® products: APA131-V3, 2014, Berkshire, UK.

[22] Instruction for use: Immunoassay latex agglutination for fecal occult blood product: 380094-B, 2011, Eiken Chemical Co., Ltd., Japan.

[23] ชยันตร์ธร ปทุมานนท์, 2556, สถิติศาสตร์คลินิก, หน่วยระบาดวิทยาคลินิก ศูนย์วิจัยคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี, 272 น.

[24] Allison, J.E., Sakoda ,L.C., Levin, T.R., *et al*., 2007, Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: Update on performance characteristics, J. Natl. Cancer Inst. 99: 1462-1470.

[25] Sobhani, I., Alzahouri, K. and Ghout, I., 2011, Cost-effectiveness of mass screening for colorectal cancer: Choice of fecal occult blood test and screening strategy, Dis. Colon Rectum. 54: 876-886.

[26] U.S. Preventive Services Task Force, 2008, Screening for colorectal cancer: U.S. preventive services task force recommendation statement, Ann. Int. Med. 149: 627-637.

[27] Ahlquist, D.A., Skoletsky, J.E. and Boynton,

K.A., 2000, Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: Feasibility of a multi target assay panel, Gastroenterology 119: 1219-1227.

[28] Elsafi, S.H., Alqahtani, N.I., Zakary, N.Y. and Al Zahrani, E.M., 2015, The sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios of fecal occult blood test for the detection of colorectal cancer in hospital settings, Clin. Exp. Gastroenterol. 8: 279-284.

[29] Faivre, J., Dancourt, V. and Lejeune, C., 2012, Screening for colorectal cancer with immunochemical faecal occult blood tests, Dig. Liver Dis. 44: 967- 973.

[30] Vilkin, A., Rozen, P. and Levi, Z., 2005, Performance characteristics and evaluation of an automated developed and quantitative, immunochemical, fecal occult blood screening test, Am. J. Gastroenterol. 100: 2519-2525.

[31] Rozen, P., Comaneshter, D. and Levi, Z., 2010, Cumulative evaluation of a quantitative immunochemical fecal occult blood test to determine its optimal clinical use, Cancer 116: 2115-2125.

[32] Young, G.P., Symonds, E.L., Allison, J.E., Cole, S.R., Fraser, C.G. and Halloran, S.P., 2015, Advances in fecal occult blood tests: The FIT revolution, Dig. Dis. Sci. 60: 609-622.

[33] McDonald, P.J., Strachan, J.A, Digby, J., Steele, R.J. and Fraser, C.G., 2011, Faecal haemoglobin concentrations by gender and age: Implications for population-based screening for colorectal cancer, Clin. Chem. Lab. Med. 50: 935-940.

[34] Turenhout, S.T., Oort, F.A., Hulst, R.W.M., Visscher, A.P., Droste, J.S.T. and Scholten, P., 2014, Prospective cross-sectional study on faecal immunochemical tests: Sex specific cut-off values to obtain equal sensitivity for colorectal cancer?, BMC. Gastroenterol. 14: 1-10.

[35] Stegeman, I., de Wijkerslooth, T.R. and Stoop, E.M., 2014, Combining risk factors with faecal immunochemical test outcome for selecting CRC screenees for colonoscopy, Gut 63: 466-471.

[36] Guittet, L., Guillaume, E., Levillain, R., *et al*., 2011, Analytical comparison of three quantitative immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer screening, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 20: 1492-1501.

[37] van Rossum, L.G., van Rijn, A.F., van Oijen, M.G., *et al*., 2009, False negative fecal occult blood tests due to delayed sample return in colorectal cancer screening, Int. J. Cancer 125: 746-750.

[38] van Roon, A.H., Hol, L. and van Vuuren, A.J. and van Leerdam, M., 2012, Are fecal immunochemical test characteristics influenced by sample return time? A population-based colorectal cancer screening trial, Am. J. Gastroenterol. 107: 99-107.