

คุณภาพของการวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีนในปัสสาวะ
โดยหลักการเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์
ของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานี
The Quality of Analysis Method for Amphetamines Drug
Abuse in Urine by Enzyme Immunoassay
at Thammasat University Hospital, Pathum Thani Province

กฤษฎา ศิริสภามารณ์*, นฤมล เสรีขจรจารุ, สุภาพร พุ่มพา

และพลากร พุทธิรักษ์

งานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

รศสุคนธ์ ธนธีระบรรจง

งานตรวจพิสูจน์สารเสพติด กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี

กระทรวงสาธารณสุข ตำบลประชาธิปัตย์ อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12130

Kridsada Sirisabhabhorn*, Narumon Sereekhajornjaru, Supaporn Pumpa

and Palakorn Puttaruk

Department of Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital,

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

Rossukhon Thanatheerabunjong

Princess Mother National Institute on Drug Abuse Treatment, Ministry of Public Health,

Prachatipat, Thanyaburi, Pathum Thani 12130

บทคัดย่อ

การตรวจสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน (AMPHs) ในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (EIA) ยังขาดการประเมินคุณภาพโดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาคุณภาพของการตรวจสาร AMPHs ในปัสสาวะด้วยวิธี EIA ของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐานแกสโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) ของงานตรวจพิสูจน์สารเสพติด สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี โดยศึกษาจากตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 62 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกและผลลบกับวิธี GC-MS ร้อยละ 53.23 (33/62) และ 46.77 (29/62) ตามลำดับมาตรวจด้วยวิธี EIA กับเครื่องตรวจวิเคราะห์โดยใช้ค่า cut-off

เท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่าวิธี EIA แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าประสิทธิภาพร้อยละ 81.82, 100.00, 100.00, 82.86 และ 90.32 ตามลำดับ และทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ด้านการทดสอบความแม่นยำของวิธี EIA กับสารมาตรฐานพบว่ามีความแม่นยำสูง แสดงค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความผันแปรน้อยกว่าร้อยละ 15 จากการศึกษาสรุปว่าวิธี EIA สำหรับการตรวจสอบสาร AMPHs ในปัสสาวะมีคุณภาพเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS อย่างไรก็ดีตาม วิธี EIA สามารถเกิดการข้ามปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นได้ จึงควรใช้ตรวจในระดับคัดกรองและควรยืนยันผลด้วยวิธีมาตรฐานต่อไป

คำสำคัญ : ตรวจวัด; แอมเฟตามีน; เมทแอมเฟตามีน; อิมมูโนแอสเสย์; ปัสสาวะ

Abstract

The measurement of amphetamines (AMPHs) drug abuse in urine by enzyme immunoassay method (EIA) is remains less in terms of quality in comparison to reference methods. Consequently, this study aims to investigate quality of EIA method for the purpose of detecting amount of AMPHs in urine samples in Thammasat University Hospital compare to the GC-MS, reference standard method, set by Princess Mother National Institute on Drug Abuse Treatment. All 62 urine samples were identified with positive and negative results of amphetamine/ methamphetamine (Pos. A/M and Neg. A/M) by GC-MS as 53.23 % (33/62) and 46.77 % (29/62), respectively. The samples were then tested using the EIA method with setting cut-off at 500 nanogram per milliliter. The results illustrated percent of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and efficiency as 81.82, 100.00, 100.00, 82.86 and 90.32 respectively. The EIA and GC-MS methods are remain significant. The traditional precision results of EIA method tried with reference standard control material announced percent of coefficient of variation (% CV) no exceed 15 %. Conclusion, EIA method for measuring AMPHs in urine is in terms of quality when compare with GC-MS. However, the EIA method has a high possibility of cross reactivity with other chemical structures so it should only be use in screening tests and should be further confirmation by GC-MS, reference standard method.

Keywords: measuring; amphetamines; methamphetamine; immunoassay; urine

1. บทนำ

สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน (amphetamines, AMPHs) เป็นสารเสพติดประเภทกระตุ้นระบบประสาท [1,2] การระบุสารเสพติดกลุ่ม AMPHs เป็นหลักฐานสำคัญในการบังคับใช้กฎหมายและการครอบครองสารเสพติดซึ่งเป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย การตรวจ

วิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีนและเมตาบอไลต์ (metabolite) ของมันในปัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (enzyme immunoassay, EIA) นิยมใช้ตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เนื่องจากสะดวกในวิธีปฏิบัติ ให้ผลเร็ว และราคาไม่สูง แต่วิธี EIA ไม่ใช่วิธีอ้างอิงมาตรฐาน (reference method)

เทียบเท่าวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography - mass spectrometry, GC-MS) [3] และวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี-เทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (liquid chromatography - tandem mass spectrometry, LC-MS-MS) [4-7] เนื่องจากวิธี EIA สามารถเกิดการข้ามปฏิกิริยา (cross-reactivity) ได้กับสารหลายชนิด ได้แก่ amantadine, bupropion, chlorpromazine, ranitidine, desipramine, fluoxetine, labetalol, methylphenidate, phentermine, phenylephrine, phenylpropanolamine, promethazine, pseudoephedrine, trazodone, 1,3 dimethylamylamine (DMAA) เป็นต้น [8-10] จึงไม่สามารถใช้ผลการตรวจเป็นหลักฐานยืนยันในทางกฎหมายได้ แต่สามารถใช้ตรวจหาปริมาณสารกลุ่ม AMPHs เบื้องต้น (quantitative screening) หรือเพื่อติดตามการรักษา (monitoring) อย่างไรก็ตาม ค่าความน่าเชื่อถือ (reliability) ของวิธีอิมมูโนแอสเสย์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลักการตรวจวิเคราะห์ เครื่องตรวจวิเคราะห์ และการเลือกใช้ค่าตัดสิ้น (cut-off) สำหรับแปลผลบวกและผลลบ

งานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานี ตรวจคัดกรองสารเสพติดกลุ่ม AMPHs ในปัสสาวะด้วย 2 วิธี วิธีแรกตรวจโดยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟี (immunochromatography, IC) [11] โดยใช้แถบทดสอบเมทาแอมเฟตามีน (methamphetamine strip) ค่า cut-off ของเมทาแอมเฟตามีนที่ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ng/mL) และหากปรากฏผลบวก (positive) ต้องตรวจวัดปริมาณสารกลุ่ม AMPHs เบื้องต้นโดยวิธี EIA ใช้ค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs ที่ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบโดยวิธี EIA ทั้งด้านความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision)

ยังคงเป็นข้อสงสัยแก่ผู้ใช้บริการและผู้ตรวจวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องการศึกษาถึงคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ของวิธี EIA โดยเทียบกับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน

ดังนั้นงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาความน่าเชื่อถือในเชิงคุณภาพสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่ม AMPHs ในปัสสาวะโดยวิธี EIA โดยศึกษาความถูกต้องของการตรวจโดยวิธี EIA ของงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานี เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน GC-MS ของงานตรวจพิสูจน์สารเสพติด กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี จังหวัดปทุมธานี (สถาบันธัญญารักษ์) และศึกษาความแม่นยำของวิธี EIA เพื่อใช้เป็นข้อมูลความน่าเชื่อถือของวิธี EIA และเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาคุณภาพการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่ม AMPHs ในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

2.1 กลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ศึกษา

ปัสสาวะตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 62 ตัวอย่าง (N=62) ซึ่งเป็นจำนวนช่วงกึ่งกลางระหว่าง 40 ถึง 100 ตัวอย่างเพื่อให้มีความเหมาะสมและเพิ่มความน่าเชื่อถือสำหรับการทดสอบแบบเปรียบเทียบตามคำแนะนำของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) และ Linnet ในปี ค.ศ. 1999 [12,13] เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (°C) ของงานตรวจพิสูจน์สารเสพติด กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี จังหวัดปทุมธานี (สถาบันธัญญารักษ์) และผ่านการรับรองจริยธรรมวิจัยอ้างอิงเลขที่ 029/2559 โดยคณะกรรมการด้านจริยธรรมการวิจัยในคนของสถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราช

ชนนี จังหวัดปทุมธานี และได้รับการยกเว้นการขอรับรองด้านจริยธรรม โดยอนุกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 3 สาขาวิทยาศาสตร์ อ้างอิงหมายเลข 061/2558 ปัสสาวะจะถูกบรรจุลงในกล่องปิดฝามิดชิดภายในมีเจลแช่แข็งเย็นเพื่อรักษาอุณหภูมิให้คงที่ จากนั้นนำส่งงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานีอย่างรวดเร็วและวางปัสสาวะไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที ก่อนตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์โดยวิธี EIA

2.2 การตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่ม AMPHs โดยวิธี EIA

ใช้ปริมาณปัสสาวะตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร (μL) ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี EIA ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ VITROS[®] FS 5,1 (Ortho-Clinical Diagnostics a Johnson & Johnson company, 2013, Rochester, NY) ของงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดปทุมธานี โดยใช้ค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs ที่ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หากความเข้มข้นของสารกลุ่ม AMPHs น้อยกว่า 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แปลผลเป็นผลลบและหากความเข้มข้นของสารกลุ่ม AMPHs มากกว่าหรือเท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แปลผลเป็นผลบวก

2.3 การทดสอบความแม่นยำของการตรวจโดยวิธี EIA

ศึกษาความแม่นยำ (precision) ของวิธี EIA โดยการตรวจวัดซ้ำแบบ traditional precision [14] กับสารควบคุมคุณภาพมาตรฐานประจำวัน (commercial control material) จำนวน 5 ระดับ ความเข้มข้น (level) (DAT, VITROS[®] 5,1 Ortho-Clinical Diagnostics a Johnson & Johnson

company, 2013, Rochester, NY) ได้แก่ DAT1, DAT2, DAT3, DAT4 และ DAT5 โดยตรวจวัดซ้ำ (repeatability) จำนวน 24 ครั้ง ในแต่ละระดับและคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความผันแปร (percent of coefficient of variation, % CV) ของวิธี EIA จากสูตร

$$\% \text{ CV} = (\text{SD} \times 100) \div \text{mean}$$

2.4 การวิเคราะห์ผลความน่าเชื่อถือเชิงคุณภาพของวิธี EIA

2.4.1 วิเคราะห์ผลความถูกต้องของวิธี EIA โดยเทียบกับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน GC-MS

นำผลการตรวจของวิธี EIA (ข้อ 2.2) เปรียบเทียบกับผลการตรวจโดยวิธี GC-MS (cut-off ของ amphetamine/methamphetamine (A/M) ที่ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จากงานตรวจพิสูจน์สารเสพติด กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี จังหวัดปทุมธานี (สถาบันธัญญารักษ์) และศึกษาความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีโดยใช้สถิติไคสแควร์ (χ^2 test) กำหนดระดับความเชื่อมั่น (α) เท่ากับ 0.05 จากโปรแกรม Stata[®] version 13.0 และวิเคราะห์ความไว (% sensitivity) ความจำเพาะ (% specificity) positive predictive value (% PPV) negative predictive value (% NPV) และประสิทธิภาพ (% efficiency) ของวิธี EIA (cut-off ของ AMPHs ที่ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS โดยกำหนด TP (true positive) หมายถึง ผลบวกจริง TN (true negative) หมายถึง ผลลบจริง FP (false positive) หมายถึง ผลบวกปลอม และ FN (false negative) หมายถึง ผลลบปลอม และวิเคราะห์ผลโดยใช้สูตรดังนี้ $\% \text{ sensitivity} = [\text{TP} \div (\text{TP} + \text{FN})] \times 100$, $\% \text{ specificity} = [\text{TN} \div (\text{FP} + \text{TN})] \times 100$, $\% \text{ PPV} =$

$[TP \div (TP + FP)] \times 100$, % NPV = $[TN \div (FN + TN)]$ และ % efficiency = $[(TN + TP) \div (TN + TP + FN + FP)] \times 100$ [7,15]

2.4.2 วิเคราะห์ผลความแม่นยำของวิธี EIA

โดยการตรวจวัดซ้ำแบบ traditional precision

วิเคราะห์ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความผันแปร (% CV) สามารถยอมรับได้ (acceptable) ไม่เกินร้อยละ 15 [13]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการตรวจสอบสาร amphetamine/methamphetamine (A/M) ในปัสสาวะจากงานตรวจพิสูจน์สารเสพติด กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี จังหวัดปทุมธานี โดยวิธี GC-MS

ซึ่งสามารถจำแนกผลตามตารางที่ 1

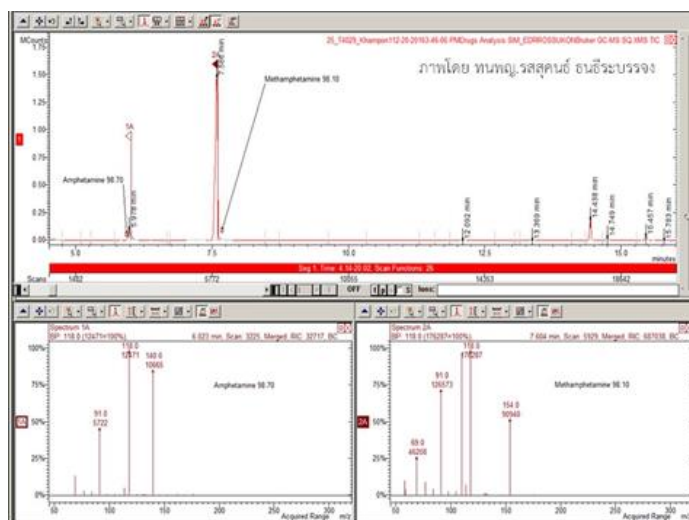
ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจโดยวิธี GC-MS เป็นผลบวก (positive A/M) จำนวน 33 ราย ผลลบ

(negative A/M) จำนวน 29 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.23 และ 46.77 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด (N=62) ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบสาร A/M ในปัสสาวะจากงานตรวจพิสูจน์สารเสพติด กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี จังหวัดปทุมธานี โดยวิธี GC-MS

ผลการตรวจโดยวิธี GC-MS	กผล / Nทั้งหมด (%)
ผลลบ (negative A/M)	29/62 (46.77)
ผลบวก (positive A/M)	33/62 (53.23)
รวม	62/62 (100.00)

positive A/M หมายถึง ผลบวก (มีปริมาณ amphetamine/methamphetamine (A/M) ≥ 250 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร) และ negative A/M หมายถึง ผลลบ (มีปริมาณ A/M < 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



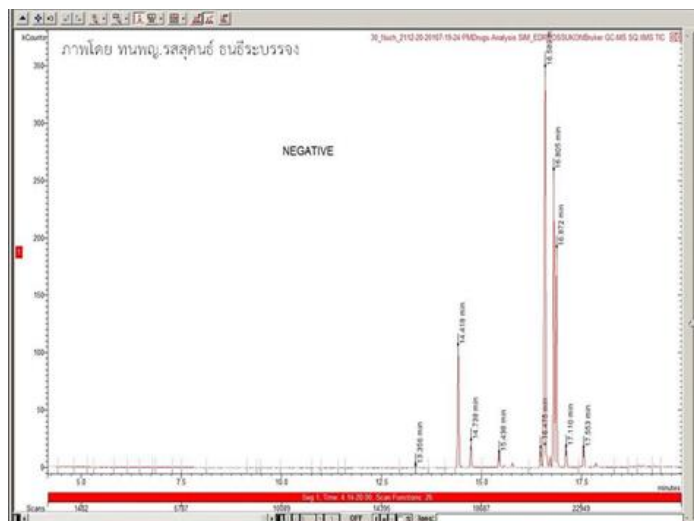
รูปที่ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรม (chromatogram) จากวิธี GC-MS แสดงผลการตรวจยืนยันสารเสพติดกลุ่ม AMPHs ที่ให้ผลบวกทั้ง amphetamine และ methamphetamine (positive A/M)

นำปัสสาวะทั้งหมด (N=62) ในข้อ 3.1 มาตรวจโดยวิธี EIA ณ งานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จังหวัด

ปทุมธานี แผลผลการทดสอบโดยใช้ค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs เท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร [16] และศึกษาถึงผลกระทบต่อกุณภาพการตรวจ

วิเคราะห์ของวิธี EIA หากปรับลดค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs เท่ากับ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับค่า cut-off ของวิธีอ้างอิงมาตรฐาน GC-MS

โดยสามารถแสดงการแปลผลการตรวจโดยวิธี EIA ที่ใช้ค่า cut-off ต่างกันตามตารางที่ 2



รูปที่ 2 ตัวอย่างโครมาโตแกรม (chromatogram) จากวิธี GC-MS แสดงผลการตรวจยืนยันสารเสพติดกลุ่ม AMPHs ที่ให้ผลลบทั้ง amphetamine และ methamphetamine (negative A/M)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่ม AMPHs ของวิธี EIA โดยใช้ค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs ที่ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลการแปลผลของวิธี EIA แต่ละค่า cut-off	วิธี EIA $n_{\text{ผล}} / N_{\text{ทั้งหมด}}$ (ร้อยละ, %)	
	ค่า cut-off 500 ng/mL	ค่า cut-off 250 ng/mL
ผลลบ (negative)	35/62 (56.45)	21/62 (33.87)
ผลบวก (positive)	27/62 (43.55)	41/62 (66.13)
รวม	62/62 (100.00)	62/62 (100.00)

3.2 การแปลผลตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่ม AMPHs ของวิธี EIA โดยใช้ค่า cut-off ที่ระดับความเข้มข้นของสารกลุ่ม AMPHs ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 พบว่าหากปรับลดค่า cut-off เท่ากับ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะแสดงผลบวกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 43.55 เป็นร้อยละ 66.13 ในขณะที่แสดงผลลบลดลงจากร้อยละ 56.45 เป็น 33.87 และหากนำผลที่ได้ไปเทียบกับวิธี GC-MS ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง

มาตรฐานจะแสดงผลตามตารางที่ 3

3.3 การเปรียบเทียบผลของวิธี EIA โดยใช้ค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs ที่ต่างกันโดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS

ตารางที่ 3 หากนำผลการตรวจด้วยวิธี EIA ที่ใช้ค่า cut-off ของ AMPHs ที่ระดับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แปลผลโดยเทียบกับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน GC-MS พบว่าวิธี EIA

ที่ใช้ค่า cut-off เท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลบวกจริง ผลลบจริง ผลบวกหลง และผลลบหลง ร้อยละ 43.55, 46.77, 0.00 และ 9.68 ตามลำดับ ในขณะที่วิธี EIA ที่ใช้ค่า cut-off เท่ากับ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลบวกจริง ผลลบจริง ผลบวกหลง

และผลลบหลงร้อยละ 51.61, 32.26, 14.52 และ 1.61 ตามลำดับ จากนั้นทดสอบความสัมพันธ์ของวิธี EIA และ GC-MS โดยสถิติไคสแควร์ (Chi-square; χ^2) ของโปรแกรมสำเร็จรูป Stata® version 13.0 แสดงผลความสัมพันธ์ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ผลของวิธี EIA โดยใช้ค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs ที่ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS

ลำดับ	ผลการเปรียบเทียบกับวิธี GC-MS	n _{ผล} / N _{ทั้งหมด} (ร้อยละ; %)	
		ค่า cut-off 500 ng/mL	ค่า cut-off 250 ng/mL
1	ผลบวกจริง, TP	27/62 (43.55)	32/62 (51.61)
2	ผลลบจริง, TN	29/62 (46.77)	20/62 (32.26)
3	ผลบวกหลง, FP	0/62 (0.00)	9/62 (14.52)
4	ผลลบหลง, FN	6/62 (9.68)	1/62 (1.61)
รวม		62/62 (100.00)	62/62 (100.00)

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจด้วยวิธี EIA ที่ใช้ค่า cut-off เท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค่า cut-off เท่ากับ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS โดยใช้สถิติไคสแควร์ (χ^2)

วิธี EIA (N=62)	GC-MS (N=62)				รวม		P-value
	ผลลบ (%)		ผลบวก (%)				
	ค่า cut-off (ng/mL)		ค่า cut-off (ng/mL)		ค่า cut-off (ng/mL)		
	500	250	500	250	500	250	
ผลลบ (%)	(TN)		(FN)		(TN + FN)		<0.001
	29/35 (82.86)	20/21 (95.24)	6/35 (17.14)	1/21 (4.76)	35/35 (100.00)	21/21 (100.00)	
ผลบวก (%)	(FP)		(TP)		(FP + TP)		
	0/27 (0.00)	9/41 (21.95)	27/27 (100.00)	32/41 (78.05)	27/27 (100.00)	41/41 (100.00)	
รวม	(TN + FP)		(FN + TP)		(TN + FN + FP + TP)		
	29/62 (46.77)	29/62 (46.77)	33/62 (53.23)	33/62 (53.23)	62/62 (100.00)	62/62 (100.00)	

3.4 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจด้วยวิธี EIA ที่ใช้ค่า cut-off ของความเข้มข้นสารกลุ่ม AMPHs ต่างกันกับวิธีมาตรฐาน GC-MS

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบความสัมพันธ์ของวิธี GC-MS และวิธี EIA ของทั้งสองค่า cut-off พบว่ามีความสัมพันธ์กัน ($p < 0.001$) ที่ระดับความเชื่อมั่นแอลฟา (α) เท่ากับ 0.05 จากนั้นจึงประเมิน

คุณภาพการตรวจวิเคราะห์ของวิธี EIA ที่ใช้ระดับค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs เท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ข้อมูลจากตารางที่ 3 คำนวณค่าร้อยละของความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิภาพ แสดงผลตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการประเมินคุณภาพของวิธี EIA ที่ใช้ค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs เท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS

ลำดับ	ผลการประเมินวิธี EIA	ร้อยละ (%)		95 % CI	
		ค่า cut-off (ng/mL)		ค่า cut-off (ng/mL)	
		500	250	500	250
1	ความไว (sensitivity)	81.82	96.97	65.00-93.00	84.00-100.00
2	ความจำเพาะ (specificity)	100.00	68.97	88.00-100.00	49.00-85.00
3	ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value)	100.00	78.05	87.00-100.00	62.00-89.00
4	ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value)	82.86	95.24	66.00-93.00	76.00-100.00
5	ประสิทธิภาพ (efficacy)	90.32	83.87	-	-

3.5 การประเมินความน่าเชื่อถือเชิงคุณภาพของวิธี EIA โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS

ตารางที่ 5 พบว่าวิธี EIA ที่ใช้ระดับค่า cut-off ของสารกลุ่ม AMPHs เท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงค่าร้อยละของความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิภาพ ในช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95 % CI) เท่ากับ 81.82 (65.00-93.00), 100.00 (88.00-100.00), 100.00 (87.00-100.00), 82.86 (66.00-93.00) และ 90.32 ตามลำดับ และหากปรับลดค่า cut-off เท่ากับ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะแสดงค่าร้อยละของความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิภาพในช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เท่ากับ 96.97 (84.00-100.00), 68.97 (49.00-85.00), 78.05 (62.00-89.00), 95.24 (76.00-100.00) และ 83.87 ตามลำดับ จากการศึกษาทำให้ทราบว่าวิธี EIA ที่ใช้ค่า cut-off เท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าประสิทธิภาพสูงกว่าร้อยละ 80 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Smith และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 ที่เคยรายงานว่าวิธีอิมมูโนแอสเสย์ของเครื่องตรวจวิเคราะห์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ EMIT[®] II Plus, KIMS[®] II และ DRI[®] แสดงค่าความไว ความจำเพาะ และค่าประสิทธิภาพสูงประมาณร้อยละ 90.00 เมื่อเทียบกับวิธี GC-MS (ค่า cut-off ที่ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) [17] นอกจากนี้พบว่ายังสอดคล้องกับ

การศึกษาของ Verstraete และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 ซึ่งรายงานความไวและความจำเพาะของเครื่องตรวจวิเคราะห์หลักการอิมมูโนแอสเสย์แสดงในช่วงร้อยละ 48.90-100.00 และในช่วงร้อยละ 96.10-100.00 [6] ตามลำดับ อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Schwartz และคณะ ในปี ค.ศ. 1991 ซึ่งรายงาน่วาวิธีอิมมูโนแอสเสย์แสดงค่าทำนายผลบวกอยู่ในช่วงร้อยละ 80.00-90.00 [18] อย่างไรก็ตาม วิธีมาตรฐาน GC-MS ผู้เชี่ยวชาญได้พิจารณาเลือกใช้ค่า cut-off น้อยกว่าระดับค่า cut-off ของวิธี EIA เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงต่อโครงสร้างสารเสพติดกลุ่ม AMPHs ทั้งแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าหากปรับลดค่า cut-off จะส่งผล

ให้มีค่าความไวสูงขึ้นแต่ค่าความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวกลดลงประมาณร้อยละ 30 และมีผลบวกหลงเพิ่มขึ้นอาจทำให้สับสนเปลืองในการส่งตรวจยืนยันด้วยวิธีอ้างอิงมาตรฐาน สำหรับงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จะส่งปัสสาวะที่แสดงผลบวกโดยวิธี EIA ที่ระดับความเข้มข้นของสารกลุ่ม AMPHs ตั้งแต่ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป เมื่อตรวจยืนยันด้วยวิธีอ้างอิงมาตรฐานโดยส่งต่อภายนอกห้องปฏิบัติการต่อไป [16] สำหรับในระดับการตรวจคัดกรอง วิธี EIA ยังคงแสดงค่าความไวและค่าความจำเพาะสูงกว่าวิธี IC [19]

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแม่นยำ (precision) ของวิธี EIA สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม AMPHs โดยการตรวจวัดซ้ำแบบ traditional precision กับสารควบคุมคุณภาพ (DAT) จำนวน 5 ระดับความเข้มข้น

ระดับ	DAT 1 (ng/mL)	DAT 2 (ng/mL)	DAT 3 (ng/mL)	DAT 4 (ng/mL)	DAT 5 (ng/mL)
ช่วงค่าเป้าหมาย (target range)	302-457	539-751	651-909	1094-1450	132-298
ค่าเฉลี่ย (mean)	360.6	658.9	762.0	1250.0	227.3
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	10.8	12.7	11.6	23.9	9.00
ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความผันแปร (% C.V.)	3.0	1.9	1.5	1.9	4.0

3.6 การศึกษาความแม่นยำ (precision) ของวิธี EIA สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม AMPHs

ตารางที่ 6 พบว่าผลจากวิธี EIA โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำสูงในระดับที่ยอมรับได้ โดยแสดงค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความผันแปร (% CV) น้อยกว่าร้อยละ 15 [20] ในทั้ง 5 ระดับของความเข้มข้นของสารควบคุมคุณภาพ

วิธี EIA นี้ไม่สามารุให้ยืนยันผลการตรวจ

สารเสพติดกลุ่ม AMPHs ในปัสสาวะได้อย่างสมบูรณ์ ดังเช่นวิธีอ้างอิงมาตรฐาน GC-MS ที่สามารถนำผลการตรวจไปยืนยันในทางกฎหมายได้ [21] เนื่องจากวิธี EIA เป็นการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งสามารถเกิดการข้ามปฏิกิริยากัน [22, 23] กับสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกัน เช่น ใน phenyl ring และ amino group ที่เชื่อมกับ carbon side chain ในตำแหน่งที่ 2 [24] ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวเป็นส่วนประกอบของตัวยาหลายชนิด [8-10] สามารถทำ

ให้เกิดผลบวกลงได้ จากการศึกษาของ Casey และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ซึ่งได้เคยรายงานว่ายาบupropion มีส่วนทำให้เกิดผลบวกลงในการตรวจสารกลุ่ม AMPHs สูงถึงร้อยละ 35 [25] และจากการศึกษาของ Vidal และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 เคยรายงานว่ายาบupropion สามารถเกิดการข้ามปฏิกิริยาในวิธีอิมมูโนแอสเสย์ได้ประมาณร้อยละ 3 ถึง 17 ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาที่ได้รับ [26] นอกจากนี้ผลจากกระบวนการสั่นตป (metabolism) ของยาที่ใช้ในการรักษาอาจทำให้เกิดผลบวกลงได้ เช่น สาร meta-chlorophenylpiperazine [27] สาร labetalol สาร promethazine, chlorpromazine และสาร metformin [22,28,29] นอกจากนี้ interference ทางเคมีที่กล่าวข้างต้น ลักษณะปัสสาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ชุ่มมาก เป็นเมือก หรือไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอาจส่งผลต่อการตรวจวัดที่คลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นจึงควรเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมก่อนการทดสอบ สำหรับวิธี EIA โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์และค่า cut-off ที่ต่างกันของแต่ละห้องปฏิบัติการจะส่งผลถึงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าประสิทธิภาพต่างกัน ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานควรทราบและควรศึกษาถึงความน่าเชื่อถือของวิธีตรวจวิเคราะห์ที่ใช้โดยเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงมาตรฐาน เพื่อเป็นข้อมูลในการยืนยันคุณภาพ ความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่ม AMPHs ในปัสสาวะและสามารถนำไปพัฒนาระดับความสามารถของการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่ม AMPHs ในอนาคต

4. สรุป

คุณภาพการตรวจสารเสพติดกลุ่ม AMPHs ในปัสสาวะด้วยวิธี EIA ของงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

โดยเทียบกับวิธีมาตรฐาน GC-MS พบว่ามีประสิทธิภาพเท่ากับร้อยละ 90.32 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบร้อยละ 81.82, 100.00, 100.00 และ 82.86 ตามลำดับ และแสดงค่าความแม่นยำสูงในช่วงที่ยอมรับได้ การปรับลดค่า cut-off ของวิธี EIA จะแสดงค่าความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกลดลง แต่ทำให้ผลบวกลงเพิ่มขึ้น การตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่ม AMPHs โดยวิธี EIA เป็นการตรวจในระดับคัดกรองไม่สามารถนำไปใช้ยืนยันผลในทางกฎหมายเพราะสามารถเกิดการข้ามปฏิกิริยากับสารหลายชนิดและควรตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐาน เช่น GC-MS ต่อไป การวิจัยครั้งนี้ขอยืนยันว่าไม่มีผลประโยชน์เกี่ยวข้องใด ๆ แฝงในเชิงธุรกิจ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูสนันสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทบ 1/20/2558 และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.เกศรา ณ บางช้าง วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในงานวิจัยนี้

6. รายการอ้างอิง

- [1] Logan, B.K., 2001, Amphetamines: An update on forensic issues, J. Anal. Toxicol. 25: 400-404.
- [2] Goodwin, J.S., Larson, G.A., Swant, J., Sen, N., Javitch, J.A. and Zahniser, N.R., 2009, Amphetamine and methamphetamine differentially affect dopamine transporters *in vitro* and *in vivo*, J. Biol. Chem. 284: 2978-2989.

- [3] Li, L., Galloway, G.P., Verotta, D., Everhart, E.T., Baggott, M.J. and Coyle, J.R., 2011, A method to quantify illicit intake of drugs from urine: Methamphetamine, J. Pharmacol. Exp. Ther. 338: 31- 36.
- [4] Woodworth, A., Saunders, A.N., Koenig, J.W., Moyer, T.P., Turk, J. and Dientzen, D.J., 2006, Differentiation of amphetamine /methamphetamine and other cross-immunoreactivesympathomimeticamines in urine samples by serial dilution testing, Clin. Chem. 52: 743-746.
- [5] Stout, P.R., Bynum, N.D., Lewallen, C.M., Mitchell, J.M., Baylor, M.R. and Roperomiller, J.D., 2010, A comparison of the validity of gas chromatography-massspectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of urine samples II: Amphetamine, methamphetamine, (±)-3,4 methylenedioxy-amphetamine, (±)-3,4-methylenedioxy-methamphetamine, (±)-3,4 methylenedioxyethylamphetamine, phencyclidine, and (±)-11- nor-9-carboxy- Δ^9 tetrahydrocannabinol, J. Anal. Toxicol. 25: 430-443.
- [6] Verstraete, A.G. and Heyden, F.V., 2005, Comparison of the sensitivity and specificity of six immunoassays for the detection of amphetamines in urine, J. Anal. Toxicol. 29: 359-364.
- [7] Crooks, C.R. and Brown, S., 2010, Roche DAT Immunoassay: Sensitivity and specificity testing for amphetamines, cocaine, and opiates in oral fluid, J. Anal. Toxicol. 34: 103-109.
- [8] Riahi-Zanjani, B., 2014, False positive and false negative results in urine drug screening tests: tampering methods and specimen integrity tests, Pharmacol. On Line 1: 102-108.
- [9] DePriest, A.Z., Knight, J.L., Doering, P.L. and Black, D.L., 2013, Pseudoephedrine and false-positive immunoassay urine drug tests for amphetamine, Pharmacotherapy 33: 88-89.
- [10] Vorce, S.P., Holler, J.M., Cawrse, B.M. and Magluilo, J.Jr., 2011, Dimethylamylamine: a drug causing positive immunoassay results for amphetamines, J. Anal. Toxicol. 35: 183-187.
- [11] McDonell, M.G., Angelo, F., Sugar, A., Rainey, C., Srebnik, D. and Roll, J., 2011, A in seriously mentally ill outpatients, Am. J. Drug. Alcohol. Abuse. 37: 137-140.
- [12] 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.
- [13] Linnet, K., 1999, Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis, Clin. Chem. 1999: 45: 882-894.
- [14] Westgard, J.O., From Method Validation to Six Sigma: Translating Method Performance Claims into Sigma Metric, Available

- Source: <http://www.westgard.com/lesson78.htm>, December 22, 2016.
- [15] Peace, M.R., Tarna, L.D. and Poklis, A., 2000, Performance evaluation of four on-site drug-testing devices for detection of drugs of abuse in urine, *J. Anal. Toxicol.* 24: 589-594.
- [16] Rockville, M.D., 2009, SAMHSA Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies, Treatment episode data set (TEDS) 1998-2008, National admissions to substance abuse treatment services: Drugs and alcohol services information system series: S-50, HHS publication no. (SMA) 09-4471.
- [17] Smith, M.L., Nichols, D.C., Underwood, P., Fuller, Z., Moser, M.A., Flegel, R., Gorelick, D.A., Newmeyer, M.N., Concheiro, M. and Huestis, M.A., 2014, Methamphetamine and amphetamine isomer concentrations in human urine following controlled vicks vapoinhaler administration, *J. Anal. Toxicol.* 38: 524 –527.
- [18] Schwartz, J.G., Zollars, P.R., Okorodudu, A.O., Carnahan, J.J., Wallace, J.E. and Briggs, J.E., 1991, Accuracy of common drug screen tests, *Am. J. Emerg. Med.* 9: 166-170.
- [19] Brown, E.R.S., Jarvie, D.R. and Simpson, D., 1997, Evaluation of Bionike one-step tests for the detection of drugs of abuse in urine, *Ann. Clin. Biochem.* 34: 74-80.
- [20] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, Rockville, 22 p.
- [21] Standridge, J.B., Adams, S.M. and Zotos, A.P., 2010, Urine drug screen: a valuable office procedure, *Am. Fam. Physician.* 8: 635-640.
- [22] Vincent, E.C., Zebelman, A. and Goodwin, C., 2006, What common substances can cause false positives on urine drug screens for drugs of abuse?, *J. Fam. Pract.* 55: 893-894.
- [23] Brahm, N.C., Yeager, L.L., Fox, M.D., Farmer, K.C. and Palmer, T.A., 2010, Commonly prescribed medications and potential false positive urine drug screens, *Am. J. Health Syst. Pharm.* 67: 1344-1350.
- [24] Beal, J.M. and Block, J.H., 2011, Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 12th Ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore. 984 p.
- [25] Casey, E.R., Scott, M.G., Tang, S. and Mullins, M.E., 2011, Frequency of false positive amphetamine screens due to bupropion using the Syva EMIT II immunoassay, *J. Med. Toxicol.* 7: 105-108.
- [26] Vidal, C. and Skripuletz, T., 2007, Bupropion interference with immune-

- assays for amphetamines and LSD, Ther. Drug. Monit. 29: 373-375.
- [27] Baron, J.M., Griggs, D.A., Nixon, A.L., Long, W.H. and Flood, J.G., 2011, The trazodone metabolite meta-chlorophenylpiperazine can cause false-positive urine amphetamine immunoassay results, J. Anal. Toxicol. 35: 364-368.
- [28] Saitman, A., Park, H.D. and Fitzgerald, R.L., 2014, False-positive interferences of common urine drug screen immune-assays: a review, J. Anal. Toxicol. 38: 387-396.
- [29] Kaplan, Y.C., Erol, A. and Karadaş, B., 2012, False-positive amphetamine/ecstasy (MDMA/3,4 methylenedioxymethamphetamine) (CEDIA) and ecstasy (MDMA/3,4-methylenedioxymethamphetamine) (DRI) test results with fenofibrate, Ther. Drug. Monit. 34: 493-495.