

การเปรียบเทียบการตรวจย้อมวินิจฉัยเชื้อไวรัสเอ็บสไตน์-บาร์ (Epstein-Barr virus : EBV)

ในเนื้อเยื่อมะเร็งหลังโพรงจมูก โดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีกับเทคนิคระดับโมเลกุล

ศุภกิตทิพย์ ตูจินดา วทบ., วท.ม.

นิพนธ์ ประดิษฐกุล พ.บ.

กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Abstract : Comparison of Epstein-Barr virus (EBV) Detection in Nasopharyngeal Carcinoma between Immunohistochemical Technique (IHC) and In Situ Hybridization Technique (ISH)

Tujinda S

Pradiphol N

Department of Pathology, Rajavithi Hospital, Khwang Thung Phyathai, Khet Ratcha Thewi, Bangkok, 10400

(E-mail : Supatitujinda@hotmail.com)

บทคัดย่อ

Nasopharyngeal carcinoma biopsy specimens from 100 patients in Rajavithi Hospital were studied for the presence of Epstein-Barr virus (EBV) in order to determine the suitable and sufficient detection method in routine practice. Since Epstein-Barr virus (EBER ISH) is very specific, therefore it was used as the gold standard, compared with an immunohistochemical technique (IHC). The sensitivity and the specificity of IHC were 90.7% and 71.4%, respectively. The positive predictive value or post-test likelihood if test positive was 95.1%. The negative predictive value and post-test likelihood if test negative were 55.6% and 44.4 %, respectively. The accuracy was 88%. The prevalence of EBV in this study was 86%. We concluded for routine practice that IHC appeared to be reliable, suitable and sufficient to diagnose the presence of EBV. Moreover, in this study, IHC also showed more advantages over the gold standard (EBER ISH) because of its simplicity, rapidity and cheapness.

Keywords : EBV, IHC technique, EBER ISH technique

ชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งหลังโพรงจมูกของผู้ป่วยโรงพยาบาลราชวิถีจำนวน 100 ราย ถูกนำมาศึกษาตรวจหาเชื้อไวรัสเอ็บสไตน์-บาร์ เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการนำมาใช้ในงานประจำโดยเปรียบเทียบกับมาตรฐานระดับโมเลกุล ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจหาเชื้อโดยใช้วิธีการย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ผลการเปรียบเทียบพบว่าวิธีการย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมีความไวและความจำเพาะ 90.7% และ 71.4% ตามลำดับ ค่าความสามารถในการทำนายผลการติดเชื้อถ้าผลการทดสอบเป็นบวก หรือโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อหลังการทดสอบถ้าผลการทดสอบเป็นบวกมีค่าเท่ากับ 95.1% ส่วนค่าความสามารถในการทำนายผลการติดเชื้อถ้าผลการทดสอบเป็นลบและโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อหลังการทดสอบ ถ้าผลการทดสอบเป็นลบมีค่าเท่ากับ 55.6% และ 44.4% ตามลำดับ สำหรับค่าความถูกต้องของเทคนิคนี้มีค่าเท่ากับ 88% ความชุกของการติดเชื้อไวรัสเอ็บสไตน์-บาร์ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 86% สรุปได้ว่าการตรวจหาเชื้อไวรัสเอ็บสไตน์-บาร์โดยวิธีการย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นวิธีการที่เชื่อถือได้มีความเหมาะสมและเพียงพอต่อการตรวจหาเชื้อในงานประจำวันนอกจากนี้จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย ให้ผลรวดเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานระดับโมเลกุล

คำสำคัญ : เอ็บสไตน์-บาร์ไวรัส เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี เทคนิคระดับโมเลกุล

Epstein-Barr virus (EBV) หรือที่เรียกว่า Human herpes virus 4 (HHV4) อยู่ใน Family Herpes viridae สามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการสัมผัสใกล้ชิด พบได้บ่อยมากโดยการจูบ เนื่องจากมีปริมาณเชื้ออยู่ในน้ำลายจำนวนมาก นอกจากนี้ยังสามารถติดต่อจากแม่ไปสู่ลูก รวมทั้งการให้เลือดที่มีเชื้อไปสู่ผู้รับที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน EBV มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิด ตั้งแต่โรคที่ไม่มีความรุนแรงและหายได้เองไปจนถึงโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งกระเพาะอาหารบางชนิด มะเร็งหลังโพรงจมูก ในคนส่วนใหญ่แล้ว เชื้อ EBV เป็นไวรัสที่ไม่มีอันตราย แต่ในคนที่ภูมิคุ้มกันไม่ดี เชื้อ EBV อาจเป็นสาเหตุของโรคร้ายแรงถึงแก่ชีวิตได้ ปัจจัยที่ทำให้เกิดการติดเชื้อขึ้นอยู่กับ อายุ เพศ เชื้อชาติ และ HIV status¹⁻² EBV มีสารพันธุกรรมเป็น DNA เกลียวคู่ เส้นตรง (linear double stranded DNA) พันรอบแกนโปรตีน และหุ้มด้วยกลุ่มโปรตีนรูปก้อน (Nucleocapsid) รอบนอกห่อหุ้มโดย envelope ที่มี glycoprotein 350/220 (gp350/220) ซึ่งจะจับกับตัวรับ CD21 ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ host cell³ EBV จะถอดรหัสให้โปรตีนมากกว่า 100 ชนิดระหว่างที่ไวรัสมีการแบ่งตัว โปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญในการควบคุม expression ของยีนไวรัส การเพิ่มจำนวน DNA การสร้างโครงสร้างของไวรัส และการเปลี่ยนแปลงภูมิคุ้มกันของ host เป็นต้น การติดเชื้อ EBV ใน epithelial cell จะทำให้เกิดการแบ่งตัวของไวรัส และนำไปสู่การทำลายเซลล์ (cell lysis) ในที่สุด ในทางตรงข้ามการติดเชื้อ EBV ใน B-cells จะทำให้เกิดการติดเชื้อแบบแอบแฝง (latent infection) โดยไม่แบ่งตัว ในระยะแอบแฝง EBV จะสร้างโปรตีนออกมาเพียง 10 ชนิด (latent gene product) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่ม Nuclear proteins (EBNA1, EBNA2, EBNA3a, EBNA3b, EBNA3c, EBNA-LP)
2. กลุ่ม Nontranslated RNA (EBV encoded small RNAs, ได้แก่ EBER 1 และ EBER 2)
3. กลุ่ม Membrane proteins (LMP1 และ LMP2) Latent membrane protein 1 (LMP1) เป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในคนโดยเฉพาะมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Non-Hodgkin's lymphoma, T-cell and B-cell) และมะเร็งหลังโพรงจมูก (Nasopharyngeal carcinoma)⁴⁻⁶ กล่าวโดยสรุปคือโปรตีนที่ EBV สร้างขึ้นมามีผลต่อ host cell ทำให้เนื้อเยื่อของ host เป็นมะเร็งโดยกระบวนการสำคัญ 4 ประการคือ
 1. ยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของ cell
 2. เกิด genetic instability
 3. กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์
 4. ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะที่ (local immune response)

สำหรับมะเร็งหลังโพรงจมูก (NPC) จัดเป็นหนึ่งในสิบอันดับแรกของมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทย พบอุบัติการณ์ในผู้ชายมากกว่าในผู้หญิงประมาณ 2 เท่า ส่วนมากอยู่ในวัยหนุ่มสาวถึงกลางคน NPC แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

1. keratinizing squamous cell carcinoma
2. non-keratinizing squamous cell carcinoma
3. undifferentiated carcinoma

โดยเฉพาะ 2 ชนิดหลังเกือบทุกรายพบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ EBV⁷ นอกจากนั้นยังมีการตรวจพบสารพันธุกรรม (DNA) ของ เชื้อ EBV ในเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกชนิด Poorly differentiated ซึ่งถ้าตรวจพบในระยะเริ่มแรกก็จะมีโอกาสเข้ารับการรักษาแต่เนิ่นๆ ในขณะที่ผู้ป่วยยังคงมีสุขภาพแข็งแรงพอที่จะได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นผลดีต่อผู้ป่วย การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ EBV ทางห้องปฏิบัติการมีด้วยกันหลายวิธีดังนี้

1. Serological diagnosis ได้แก่ การตรวจหา Ab ต่อ viral capsid Ag (VCA) โดยใช้เทคนิค ELISA⁸
2. Electron microscopy เป็นการตรวจหาเชื้อ EBV จากตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อซึ่งทำได้ยากและแทบไม่พบเลย
3. Immunohistochemical study (IHC) เป็นการศึกษาหาโปรตีนของเชื้อ EBV ที่อยู่ในเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ เพื่อให้ทราบถึงระยะต่างๆ ของการติดเชื้อ สามารถแสดงให้เห็นได้ว่าการติดเชื้อ EBV พบอยู่ในเซลล์กลุ่มใดโดยการใช้ Ab ต่อ latent membrane protein 1 (LMP1)^{2,10}
4. Molecular diagnosis แบ่งเป็น

4.1 EBV genome detection เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อ EBV โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แต่วิธีนี้ไม่สามารถบอกข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งการกระจายตัวของเชื้อ EBV (cellular localization) ภายในเซลล์ได้¹¹

4.2 EBV- encoded small RNA (EBER) โดยวิธี in situ hybridization (ISH) เป็นการตรวจหา EBERS (EBER1 และ EBER 2) ในนิวเคลียสของเซลล์โดยวิธี ISH ซึ่งมีประโยชน์ต่อการตรวจหา EBV genome ในระยะการติดเชื้อแอบแฝง (latent infection) ในเนื้อเยื่อและเซลล์มะเร็ง วิธีนี้มีความไวสูงและยังสามารถระบุตำแหน่งของเซลล์ที่มีการติดเชื้อได้ จัดเป็นวิธีทดสอบมาตรฐาน (gold standard) นอกจากนั้นวิธีนี้ยังสามารถตรวจหาเชื้อ EBV ในระยะการติดเชื้อแอบแฝงได้ทุกรูปแบบ อีกทั้งยังสามารถแสดงให้เห็นได้ว่าการติดเชื้อ EBV พบในเซลล์กลุ่มใดเช่นเดียวกับการใช้เทคนิค IHC เทคนิคนี้จึงมีความไวสูงกว่าการตรวจด้วยเทคนิค IHC^{2,11,12}

4.3 การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี Real Time PCR (Quantitative analysis of EBV in plasma by real time PCR method) เป็นการตรวจหาปริมาณ DNA ของเชื้อ EBV ในเลือด

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ EBV ในปัจจุบันที่นิยมทำได้แก่ Immunohistochemical study (IHC) และ EBV-encoded RNA in situ hybridization (EBER ISH) มีการศึกษาพบว่า การตรวจหาเชื้อ EBV ด้วยวิธี IHC มีความไวเพียง 40% เท่านั้น^{2,12} ในขณะที่การตรวจ EBER ISH มีความไวสูงมากกว่า 90% เนื่องจากตัวไวรัสจะทำให้ tumor cells ผลิต viral protein ที่เป็น nucleic protein เช่น EBNA1 เป็นต้นหรือที่เป็น membrane protein เช่น LMP1, LMP2 ได้ในจำนวนจำกัดแต่สำหรับ EBERS (กลุ่ม nontranslated RNA) จะมีเป็นจำนวนมากใน tumors cells (มากกว่า 1 ล้าน copies/cell)^{2,13} เทคนิคนี้จะช่วยให้การวินิจฉัยทางพยาธิวิทยามีความแม่นยำถูกต้องมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิค IHC ปัจจุบันได้ถูกนำมาพัฒนาปรับปรุงให้ผลรวดเร็วและมีประสิทธิภาพช่วยให้การวินิจฉัยโรคมีความแม่นยำสูงขึ้น นอกจากนั้นค่าใช้จ่ายในการตรวจก็ถูกกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธี ISH ซึ่งเป็นวิธีทดสอบมาตรฐาน^{2,12} การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ EBV โดยวิธีการตรวจด้วยเทคนิค IHC กับวิธีทดสอบมาตรฐาน EBER ISH ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมและเพียงพอสำหรับการตรวจหาเชื้อ EBV ในงานประจำ

วัตถุประสงค์และวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการทดสอบเพื่อการวินิจฉัย (diagnostic test) จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลราชวิถีที่ได้รับการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal biopsy) และได้รับการตรวจวินิจฉัยแล้วว่าเป็นมะเร็งหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal carcinoma) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ถึงปี พ.ศ. 2558 ระยะเวลาในการศึกษาเริ่มตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2559 สำหรับขนาดตัวอย่างผู้ศึกษาใช้การคำนวณจากสูตรการประมาณค่าสัดส่วนอย่างง่าย (estimated single proportion)¹⁴ โดยผู้ศึกษากำหนดค่าความไวที่ร้อยละ 80 กำหนดค่าความคลาดเคลื่อนที่ร้อยละ 20 และกำหนดระดับนัยสำคัญ α ที่ 0.05 ดังนี้

ขนาดตัวอย่างเพื่อให้หา Sensitivity

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 p(1-p)}{d^2}$$

n = จำนวนขนาดตัวอย่าง

p = ผู้ศึกษากำหนดหากการตรวจด้วยวิธี LMP1 Stain (IHC) มีความไวและความจำเพาะในการบอกรายการติดเชื้อหรือไม่ติดเชื้อได้ร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับวิธี EBER ISH ซึ่งถือว่าเป็น Gold Standard ในการศึกษาครั้งนี้จะถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

$Z_{\alpha/2}$ = ค่าสถิติภายใต้โค้งมาตรฐาน เมื่อระดับนัยสำคัญทางสถิติ $\alpha = 0.05$ คือ 1.96
 d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้นได้ กำหนดให้เป็นร้อยละ 20

ดังนั้นสามารถคำนวณหาขนาดตัวอย่างดังนี้

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.8(1-0.8)}{0.2^2}$$

$n = 16$ ราย

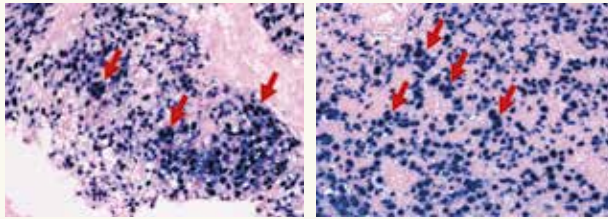
จากการคำนวณได้จำนวนขนาดตัวอย่าง = 16 ราย และจากการศึกษานำร่องพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจหาเชื้อ EBV ไม่พบการติดเชื้อร้อยละ 20 ดังนั้นขนาดตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในครั้งนี้จึงใช้จำนวนทั้งสิ้นอย่างน้อย 16/0.2=80 รายและเพื่อข้อมูลสูญหายอีก 20 ราย รวมเป็น 100 ราย การตรวจหาเชื้อ EBV ด้วยเทคนิค In Situ Hybridization (EBER In Situ Hybridization : EBERISH stain) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำบล็อกร่างกายชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็น nasopharyngeal carcinoma (NPC) มาตัดเป็นแผ่นบางๆ ประมาณ 3 ไมครอน
2. ตีเรียงแผ่นเนื้อเยื่อลงบน coated slide (positive charged slide)
3. ติด bar code label ลงบนสไลด์
4. นำสไลด์ทั้งหมดมาเรียงลงบนฐานสำหรับวางแผ่นสไลด์ของเครื่องย้อมอัตโนมัติ (Bench Mark XT Automated Slide Stainers)
5. วาง reagents ทั้งหมด ได้แก่ RNA positive control probe (Ventana, cat.No.800-2846), VentanaISH/VIEW^{Blue} Detection Kit, Ventana ISH Protease 2 และ ISH Red counterstain ลงบนเครื่องย้อม
6. ตรวจสอบปริมาณน้ำยาอื่นๆ (Accessory reagents) ได้แก่ Reaction Buffer, SSC solution, EZ prepTM, LCS ให้เพียงพอต่อการย้อม
7. ตั้ง Protocol สำหรับการย้อมแบบ Fully automated stain
8. ทำการย้อม (ใช้เวลาประมาณ 4.20 ชม.)
9. นำสไลด์ออกจากเครื่องเมื่อเสร็จสิ้นการย้อม จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการเอาน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration procedure) และ mounting slide ตามลำดับ

หมายเหตุ : ทุกสไลด์ของเนื้อเยื่อผู้ป่วย (patient specimens) จะมีเนื้อเยื่อควบคุมผลบวก (positive specimen control) ร่วมอยู่ด้วย เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพการตรวจหาเชื้อ

○ การอ่านผล

เห็นเป็นตะกอนสีน้ำเงินเข้มที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์มะเร็ง และมี Counterstain เป็นสีแดง ตามรูปที่ 1 (ภาพซ้าย) และรูปที่ 2 (ภาพขวา)



การตรวจย้อมหาเชื้อ EBV ด้วยเทคนิค LMP1 immunohistochemical stain; LMP1 stain (IHC)

1-4. เหมือนวิธีการย้อม EBER stain

5. วาง reagents ทั้งหมด ได้แก่ EBV (CSI-4; Ventana, Cat.No.760-2640), ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, Cat.No.760-500)

6-7. เหมือนวิธีการย้อม EBER ISH stain

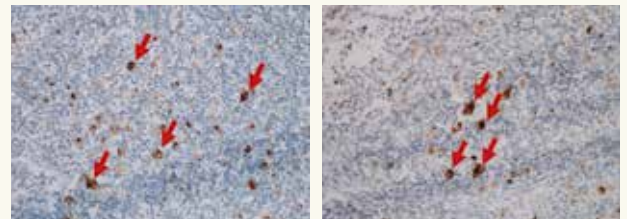
8. ทำการย้อม (ใช้เวลาประมาณ 3 ชม.)

9. นำสไลด์ออกจากเครื่องเมื่อเสร็จสิ้นการย้อม จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการเอาน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration procedure) และ mounting slide ตามลำดับ

หมายเหตุ : ทุกสไลด์ของเนื้อเยื่อผู้ป่วย (patient specimens) จะมีเนื้อเยื่อควบคุมผลบวก (positive specimen control) รวมอยู่ด้วย เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพการตรวจย้อม

○ การอ่านผล

เห็นเป็นเม็ดเล็กๆ สีน้ำตาลในบริเวณ cytoplasm และ cell membrane ของเซลล์มะเร็ง และมี counterstain เป็นสีน้ำเงินตามรูปที่ 3 (ภาพซ้าย) และรูปที่ 4 (ภาพขวา)



ผล

จากผลการตรวจย้อมวินิจฉัยเชื้อ EBV โดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (LMP1 stain) และเทคนิค In Situ Hybridization (EBER ISH stain) ในผู้ป่วยจำนวน 100 รายของโรงพยาบาลราชวิถีซึ่งมีอายุระหว่าง 16-88 ปี เป็นเพศชาย 81 ราย และเพศหญิง 19 ราย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ถึง พ.ศ. 2558 ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการวินิจฉัยโดยการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal biopsy) ผ่านการย้อม Hematoxylin and Eosin แล้วว่าเป็นมะเร็งหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal carcinoma) แบ่งตามชนิดได้ (ตารางที่ 1) และเมื่อนำผลการตรวจย้อมทั้ง 2 เทคนิคมาเปรียบเทียบกันโดยใช้ตาราง 2x2 ให้ผล (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการวินิจฉัยชนิดของ NPC จากเนื้อเยื่อหลังโพรงจมูกของผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจย้อมวินิจฉัยเชื้อ EBV

ชนิดของ NPC	จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัย (ราย)
1. Keratinizing squamous cell carcinoma	22
2. Non-keratinizing squamous cell carcinoma	47
3. Undifferentiated carcinoma	31
รวม	100

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการตรวจย้อมวินิจฉัยเชื้อ EBV โดยวิธี EBER stain (ISH) และวิธี LMP1 stain (IHC)

		วิธีการตรวจย้อมด้วยเทคนิค EBER stain (ISH)		รวม
		พบการติดเชื้อ EBV (ราย)	ไม่พบการติดเชื้อ EBV (ราย)	
วิธีการตรวจย้อมด้วยเทคนิค LMP1 stain (IHC)	พบการติดเชื้อ EBV (ราย)	78 (TP)	4 (FP)	82
	ไม่พบการติดเชื้อ EBV (ราย)	8 (FN)	10 (TN)	18
	รวม	86	14	100

จากตารางที่ 2 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยการคำนวณจะได้ค่าต่างๆ ของการตรวจย้อมวินิจฉัยเชื้อ EBV ด้วยเทคนิค อิมมูโนฮิสโตเคมี (LMP1 stain) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าต่างๆ ของการตรวจย้อมวินิจฉัยเชื้อ EBV ด้วยเทคนิค LMP1 stain (IHC)

การวินิจฉัย	ผล (95%CI)
ความไวของการตรวจ (sensitivity)	90.7% (82.5, 95.9)
ความจำเพาะของการตรวจ (specificity)	71.4% (41.9, 91.6)
ความสามารถในการทำนายผลการติดเชื้อถ้าผลการทดสอบเป็นบวก (positive predictive value)	95.1% (88.0, 98.7)
ความสามารถในการทำนายผลการติดเชื้อถ้าผลการทดสอบเป็นลบ (negative predictive value)	55.6% (30.8, 78.5)
โอกาสที่จะตรวจพบเชื้อหลังการทดสอบถ้าผลการทดสอบเป็นบวก (post-test likelihood if test positive)	95.1% (88.0, 98.7)
โอกาสที่จะตรวจพบเชื้อหลังการทดสอบถ้าผลการทดสอบเป็นลบ (post-test likelihood if test negative)	44.4% (21.5, 69.2)
ความถูกต้อง (accuracy)	88% (80.0, 93.6)
ความชุกของการติดเชื้อ (prevalence)	86% (77.6, 92.1)

วิจารณ์

เนื่องจากปัจจุบันเป็นที่ยอมรับแล้วว่าเชื้อ EBV เป็นสาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งหลังโพรงจมูก^{1,7,13,15-18} ดังนั้นวิธีการที่จะใช้ในการตรวจหาเชื้อได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพจึงมีบทบาทสำคัญต่อการวินิจฉัยถึงสาเหตุของโรคที่แท้จริง มีการศึกษาถึงวิธีการตรวจหาเชื้อ EBV กันมากมายหลายวิธีตลอดจนมีการเปรียบเทียบกันระหว่างวิธีต่างๆ เหล่านี้ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการหาวิธีที่ดีที่สุดในการตรวจหาเชื้อ^{2,15-18} ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ EBV ด้วยวิธีการย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีกับวิธีทดสอบมาตรฐานระดับโมเลกุล ผลการศึกษาพบว่า การตรวจหาเชื้อ EBV ด้วยวิธีการย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี มีค่าความไว และค่าความจำเพาะของการตรวจเท่ากับ 90.7% และ 71.4% ตามลำดับ ค่าความสามารถในการทำนายผลการติดเชื้อถ้าผลการทดสอบเป็นบวกหรือโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อหลังการทดสอบถ้าผลการทดสอบเป็นบวก มีค่าเท่ากับ 95.1% ค่าความสามารถในการทำนายผลการติดเชื้อถ้าผลการทดสอบเป็นลบ มีค่าเท่ากับ 55.6% นั่นหมายถึงโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อหลังการทดสอบถ้าผลการทดสอบเป็นลบ เท่ากับ 44.4%

ค่าความถูกต้องของการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิคนี้ 88% ซึ่งหมายถึงวิธีนี้สามารถบอกได้ถูกต้องทั้งในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อและไม่มีการติดเชื้อ EBV ได้ดี สำหรับความชุกของการติดเชื้อ EBV ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า 86% อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ขนาดตัวอย่างทั้งหมด 100 รายไม่พบการติดเชื้อเพียง 14 ราย จึงอาจทำให้ผลการศึกษามีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้และเพื่อให้ผลการวิจัยน่าเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้นจึงควรเพิ่มขนาดตัวอย่างให้มากขึ้นกว่านี้ ปัจจุบันมีการตรวจย้อมด้วยเครื่องย้อมอัตโนมัติที่ได้มาตรฐาน การย้อมด้วยวิธี LMP1 stain (IHC) สามารถให้ผลการตรวจที่รวดเร็วภายใน 3 ชั่วโมง ต้นทุนต่อ test เท่ากับ 550 บาทเมื่อเทียบกับเทคนิค EBER ISH ซึ่งมีต้นทุนต่อ test เท่ากับ 2,000 บาท

สรุป

การตรวจหาเชื้อ EBV โดยวิธีการย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมีความถูกต้องเชื่อถือได้ จึงนับว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ EBV ในงานประจำเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานระดับโมเลกุล

References

1. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P. EBV DNA in biopsies of Burkitt's tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970; 228: 1056-8.
2. Gulley ML, Glaser SL, Craig FE, Borowitz M, Mann RB, Shema SJ. Guidelines for interpreting EBER ISH and LMP1 IHC tests for detecting EBV in Hodgkin Lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002; 117: 259-67.
3. Sadler RH, Raab-Traub N. Structural analyses of the EBV Bam HIA transcripts. *J Viral*. 1995;69: 1132-41.
4. Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cell. *Cell* 1985; 43: 831-40.
5. Cheung ST, Lo KW, Leung SF, Chan WY, Choi PH, Johnson PJ, et al. Prevalence of LMP1 detection variant of EBV in NPC and gastric tumors in Hong kong. *Int J Cancer* 1996; 66: 711-2.
6. Raab-Traub N. EBV in the pathogenesis of NPC. *Sc min Cancer Biol* 2002; 12: 431-41.
7. Chan JKC, Bray F, Mc Carron P, Foo W, Lee AWM, Yip T. Nasopharyngeal carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW. Reichart P, Sidransky D, eds. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. 1st ed. Albany. WHO Press; 2005.P. 81-97.
8. Klein G, Glovanella BC, Lindahl T. Direct evidence for the presence of EBV DNA and nuclear Ag in malignant epithelial cell from patients with poorly differentiated carcinoma of nasopharynx. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974; 71: 4737-41.
9. Ho HC, Ng MH, Kwan HC, Chau JC. EBV specific IgA and IgG serum Ab in NPC. *Br J Cancer* 1976; 34: 655-60.
10. Arvanitakis L, Yaseen N and Sharma S. LMP1 induces cyclin D2 expression, and loss of TGF-beta 1-mediated growth inhibition in EBV-positive B cells. *J Immunol* 1995; 155: 1047-56.
11. Melino C, Cavallo R, Bergallo M. EBV virol load monitoring by quantitative PCR in renal transplant patients. *New Microbiol* 2003; 26: 141-9.
12. Fanaian NK, Cohen C, Waldrop S, Wang J, Shehata BM. EBV-encoded RNA: automated ISH compared with manual ISH and IHC for detection of detection of EBV in pediatric lymphoproliferative disorders. *Pediatr Dev Pathol* 2009; 12: 195-9.
13. Loughrey M, Trivett M, Lade S. Diagnostic application of EBV-encoded RNA ISH. *Pathol* 2004; 36: 301-8.
14. Lwanga SK., And Lemeshow S., 1991. *Sample Size determination in health studies: A practical manual*. Geneva: W.H.O. p25-42.
15. Lauritzen AF, Hording U, Nielsen HW. EBV and Hodgkin's disease: a comparative immunological, ISH and PCR study. *AP MIS* 1994; 102: 495-500.
16. Lin JC, Wang WY, Chen KY, Wei YH, Liang WM, Jan JS. Quantification of plasma EBV DNA in patients with advanced NPC. *N Engl J Med* 2004;350: 2461-70.
17. Perez-Ordóñez B. An update on EBV and NPC. *Head Neck Pathol* 2007;1: 141-5.
18. Clemens MJ. The small RNAs of EBV. *Mol Biol Rep* 1993;17: 61-81. ●