

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาตรวจไวรัสตับ อักเสบบี โดยวิธี อีไลซ่า ที่ผลิตในประเทศ กับที่นำเข้า จากต่างประเทศ

A Comparative Study of Hepatitis B virus Detection by ELISA Test Kits : Thai Product vs Imported

สิทธิพจน์ ผลิตกุลลัษ วทบ. (เทคนิคการแพทย์), น.บ.
กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก
โรงพยาบาลนครปฐม

Sitthipoj Phalitikusoltuch B.Sc. (Medical Technology), LL.B,
Department of Clinical Pathology
Nakhonpathom Hospital.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้เปรียบเทียบการตรวจ HBsAg และ Anti-HBs ในซีรัม โดยวิธี ELISA ที่สุ่มเลือกมาจากห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา และงานธนาคารเลือด โรงพยาบาลนครปฐม จำนวน 356 ราย โดยใช้น้ำยาที่ผลิตในประเทศ และน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่ามีผลการตรวจ HBsAg เป็นบวก ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ 71 ราย และน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ 73 ราย และเมื่อนำตัวอย่างซีรัมจำนวน 303 ราย มาตรวจหา Anti-HBs พบว่าให้ผลเป็นบวก ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ 90 ราย และน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ 91 ราย ซึ่งอัตราการตรวจพบ HBsAg และ Anti-HBs ของชุดน้ำยาดังกล่าว แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหา HBsAg ของน้ำยาที่ผลิตในประเทศ กับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่าการตรวจ HBsAg ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ มีความไวร้อยละ 95.9 ความจำเพาะร้อยละ 99.6 และมีความแม่นยำร้อยละ 98.9 ของน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ และการตรวจ Anti-HBs ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ มีความไวร้อยละ 92.3 ความจำเพาะร้อยละ 97.2 และมีความแม่นยำร้อยละ 95.7 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ และความเข้มข้นต่ำสุดของ Anti-HBs ที่สามารถตรวจได้คือ 15.9 IU/l ราคา /test ของน้ำยาตรวจ HBsAg และ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ที่ผลิตในประเทศมีราคาเป็นร้อยละ 54.8 และ 35.0 ของน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าน้ำยาตรวจ HBsAg และ Anti-HBs ที่ผลิตในประเทศ มีประสิทธิภาพดีและราคาถูก และให้ผลการตรวจหา HBsAg และ Anti-HBs ไม่แตกต่างกับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น่าที่จะนำมาใช้ทดแทนน้ำยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศได้

ABSTRACT

In this study, 356 sera were sampling from Immunology laboratory and Blood Bank of Nakhonpathom hospital. Whole sera had been already studied for HBsAg by ELISA ; there were 71 positive sera by Thai product and 73 positive sera by imported product, 303 sera had been already studied for Anti-HBs by ELISA ; there were 90 positive sera by Thai product and 91 positive sera by imported product. The rate of HBsAg and Anti-HBs positive sera by Thai product and imported product were not significantly difference. ($P > 0.05$)

A comparative study for HBsAg were detected by ELISA test kit : Thai product vs imported. The Thai product gave a sensitivity of 95.9%, specificity 99.6% and an accuracy of 98.9% of imported and Anti-HBs were detected by Thai product gave a sensitivity of 92.3%, specificity 97.2% and an accuracy of 95.7% of imported. 15.9 IU/1 were the lowest of Anti-HBs had been detected by Thai product. The cost/test of test kit of HBsAg and Anti-HBs detection by Thai product were 54.8% and 35.0% of imported, respectively. Thai product had been efficiency and low cost and could detected HBsAg and Anti-HBs were not significantly difference and should be to replace imported.

Key word : HBsAg, Anti-HBs, ELISA

บทนำ

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นเชื้อไวรัสสำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบ โดยมีผู้ติดเชื้อเรื้อรังทั่วโลกมากกว่า 350 ล้านคนหรือเท่ากับประมาณร้อยละ 5 ของประชากรโลกทั้งหมดและเป็นสาเหตุสำคัญของโรคตับแข็งและโรคมะเร็งตับ โดยมีผู้เสียชีวิตเนื่องจากผลของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนี้ประมาณปีละ 1 ล้านคน¹

ตั้งแต่ Professor Baruch Blumberg ค้นพบ hepatitis B surface antigen (HBsAg) ในปี ค.ศ. 1966¹ ขณะปฏิบัติงานที่ National Institutes of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา การศึกษาโรคไวรัสตับอักเสบบีก็ได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว พบว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus) สามารถแพร่กระจายติดต่อได้หลายทาง เช่น เลือด น้ำลาย น้ำนม น้ำตา บาดแผล และการสัมผัสใกล้ชิด ประเทศไทยจัดอยู่ในเขตที่มีความชุกของโรคไวรัสตับอักเสบบีสูง โดยมีภาวะติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 6-10 ซึ่งเป็น

อัตราที่สูงกว่าประเทศแถบยุโรป หรือสหรัฐอเมริกาประมาณ 60-100 เท่าตัว²⁻⁴ นอกจากนั้นโรคนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ (primary hepatocellular carcinoma) ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทยรองจากมะเร็งปอดมดลูก⁵⁻⁶ ดังนั้นโรคไวรัสตับอักเสบบีจึงเป็นปัญหาทางการแพทย์ และสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย

ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ต้องอาศัยการตรวจซีรัมทางห้องปฏิบัติการ คือ การตรวจหา HBV markers (HBsAg, HBeAg, Anti-HBs, Anti-HBc และ Anti-HBe) ส่วน HBcAg นั้นไม่พบในซีรัม แต่จะตรวจพบได้ในเซลล์เนื้อเยื่อของตับด้วยการเจาะเนื้อตับ (liver biopsy) มาทำการตรวจหา ฉะนั้นจึงไม่นิยมที่จะทำการตรวจหา HBcAg ยกเว้นกรณีที่น่าจะเป็นจริง ๆ

การตรวจวินิจฉัยภาวะการติดเชื้อ HBV ได้พัฒนามาเป็นระยะเวลากว่า 20 ปีแล้ว โดยเริ่มจากหลักการ Agar

gel diffusion (AGD), Immunoelectrophoresis (IEP) และ Counter Immunoelectrophoresis (CIEP)⁷ วิธี AGD เป็นวิธีที่อาศัยหลักการ immunodiffusion ซึ่งเป็นวิธีแรกที่ใช้ตรวจหา HBsAg ส่วนวิธี IEP และ CIEP เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหา HBsAg และ Anti-HBs⁸ วิธีดังกล่าวข้างต้นมีความจำเพาะดี ง่าย ราคาไม่แพง แต่มีความไวต่ำ โดยสามารถตรวจหาแอนติเจน และแอนติบอดีได้ในระดับ มิลลิกรัม⁹ เนื่องจากหลักการ AGD อาศัยปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อกันในเนื้อวุ้น ทำให้มีข้อจำกัดมากกว่าหลักการ IEP และ CIEP คือใช้เวลาในการทดสอบนานกว่าและไม่สามารถแยกแอนติเจนหลาย ๆ ระบบที่รวมกันได้ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีใหม่ ๆ ในการวินิจฉัยโรค เช่น วิธี CF โดยใช้ตรวจหา HBsAg และ Anti-HBs⁷ วิธีนี้มีความไวที่ดีกว่าวิธีในรุ่นแรก ๆ โดยสามารถตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ในระดับไมโครกรัม แต่อาจมีปัญหาเรื่องผลบวกложงจากปฏิกิริยา non-specific จากสารรบกวนต่าง ๆ หลักการ CF นี้ ได้ถูกนำมาดัดแปลงเป็นวิธีใหม่คือ Microtiter complement fixation โดย Sever ในปี ค.ศ. 1962¹⁰

ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีใหม่ ๆ ที่มีความไวดีกว่าวิธีในรุ่นเก่า ๆ เช่น PHA RPHA RIA และ ELISA โดยหลักการ PHA และ RPHA มีความไวประมาณ 100-1000 เท่าของวิธี AGD วิธี PHA เป็นการตรวจหาแอนติบอดี เช่น Anti-HBs Anti-HBc และ Anti-HBe โดยใช้แอนติเจนที่จำเพาะมาเคลือบบนผิวเม็ดเลือดแดง แต่วิธี RPHA เป็นการตรวจหาแอนติเจน เช่น HBsAg และ HBeAg โดยใช้หลักการตรงข้ามกับวิธี PHA¹¹ หลักการ RIA เป็นหลักการที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสีเป็นตัวติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้ในปฏิกิริยา วิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธีอื่น ๆ แต่เนื่องจากการใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพและมีอายุการใช้งานสั้น อีกทั้งต้องใช้เครื่องมือพิเศษในการตรวจวัดที่มีราคาแพง¹² เช่น เครื่อง Gamma Counter ดังนั้นจึงมีการคิดค้นสารที่ใช้เป็นตัวติด

ฉลากแทนสารกัมมันตภาพรังสีโดยใช้แอนไซม์แทนและเรียกว่าหลักการ ELISA แต่หลักการ ELISA มีวิธีการที่ยุ่งยาก ราคาแพงเพราะต้องใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัท และต้องใช้เครื่องมือพิเศษในการตรวจวัด

HBsAg เป็น serological marker ตัวหนึ่งที่ห้องปฏิบัติการทั่วไป นิยมใช้วินิจฉัยภาวะติดเชื้อ HBV นอกจากนี้ยังนิยมใช้เป็นตัวคัดกรองโรคติดเชื้อ HBV ในเลือดของผู้บริจาคเลือดทั่วไป ในอดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการต่าง ๆ ในการตรวจหา HBsAg โดยแบ่งวิธีการทดสอบออกเป็น 3 รุ่น คือ รุ่นแรกใช้วิธี AGD ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวน้อยที่สุดและใช้ในการศึกษา subtype ของ HBsAg แต่ในปัจจุบันไม่ใช้วิธีนี้ในงานตรวจวินิจฉัย¹³ รุ่นที่สองใช้วิธี CIEP หรือวิธี Reversed passive latex agglutination ซึ่งมีความไวมากกว่าวิธี AGD ประมาณ 5-10 แต่ยังมีมีความไวน้อยกว่าวิธีทดสอบในรุ่นที่สาม¹⁴ นอกจากนี้ยังมีวิธี CF และ วิธี Rheophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธี AGD โดยอาศัยการระเหยของน้ำช่วยให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น¹³ ในปี ค.ศ. 1972 Zambazan และ Holper ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหา HBsAg โดยใช้วิธี Rheophoresis AGD CF และ CIEP ซึ่งได้ผลสรุปว่าวิธี Rheophoresis มีความไวเท่ากับวิธี CIEP และวิธี CF แต่มีความไวมากกว่าวิธี AGD¹⁰ รุ่นที่สามใช้วิธี RPHA RIA ELISA Enhanced chemiluminescence และ Fluorescence วิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน โดยมีความไวมากกว่าวิธี AGD ประมาณ 50-100 เท่า¹⁵ วิธี RPHA มีความไวในการทดสอบหา HBsAg ตั้งแต่ 5-50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร¹⁴ ซึ่งวิธีนี้สามารถเกิดผลบวกложงได้บ่อย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้วิธีอื่น ๆ ในการช่วยยืนยันผลการทดสอบ¹⁴ ซึ่งวิธีนี้สามารถเกิดผลบวกложงได้บ่อย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้วิธีอื่น ๆ ในการช่วยยืนยันผลการทดสอบ ส่วนวิธี RIA ELISA และ Enhanced chemiluminescence มีความไวในการตรวจหา HBsAg ในปริมาณ ≤ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร¹⁵ ซึ่งวิธี Enhanced chemiluminescence และ Fluorescence ใช้

หลักการเช่นเดียวกับวิธี ELISA แต่ใช้ตัวติดฉลากต่างกัน คือใช้สาร luminol แทนการใช้เอนไซม์¹⁴

ELISA เป็นวิธีการตรวจที่ให้ผลแม่นยำ มีความไวสูง และเป็นที่ยอมรับทั่วไป แต่ต้องการเครื่องมือ เวลาและ น้ำยาที่มีราคาแพงกว่า HA จากการศึกษารเปรียบเทียบ ความไวของ ELISA กับ HA^{16,17} พบว่าวิธี HA เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา HBV markers โดยเฉพาะ HBsAg และ anti-HBc โดย ELISA มีความไวสูงกว่า HA เพียง 0.5% ในการตรวจหา HBsAg และเท่ากับ HA ในการตรวจหา anti-HBc แต่เมื่อตรวจหา anti-HBs โดยวิธี ELISA จะมีความไวสูงกว่าวิธี HA ประมาณ 6-10% โดย การศึกษาของสุดาและคณะ¹⁶ แต่สูงเพียง 1% จากการ ศึกษาของยุพา และคณะ¹⁷ ซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับตัวอย่างการ ทดสอบ ซึ่งมีระดับของ anti-HBs แตกต่างกันและจาก การศึกษาของวิมล สุขธมยา และคณะ¹⁸ พบว่าการตรวจ HBsAg โดยวิธี ELISA มีความแม่นยำเทียบเท่ากับการ ตรวจโดยวิธี RIA โดยมีความแม่นยำสูงถึงร้อยละ 96.7

ปัจจุบันได้มีชุดทดสอบที่ใช้ในการตรวจ HBsAg และ Anti-HBs ซึ่งใช้หลักการ ELISA ที่ผลิตในประเทศไทย การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ต้นทุนค่าน้ำยา ความยากง่ายในการตรวจ และการควบคุม คุณภาพของชุดน้ำยาตรวจไวรัสตับอักเสบบีโดยวิธี ELISA ระหว่างน้ำยาที่ผลิตในประเทศกับที่นำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณานำชุดน้ำยาที่ผลิตในประเทศ มาใช้ในการบริการต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

สุ่มเลือกตัวอย่างตรวจเป็นซีรัมที่ส่งมาตรวจหา HBV serologic markers ที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา และงานธนาคารเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลนครปฐม โดยเป็นการตรวจหา HBsAg และ/ หรือ Anti-HBs ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ - เมษายน 2546 ซึ่งประกอบด้วยการส่งตรวจ HBsAg จำนวน 356 ราย และ Anti-HBs จำนวน 303 ราย โดยนำตัวอย่าง

ซีรัมเหล่านั้นมาตรวจหา HBsAg และ/หรือ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ และน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. CHI SQUARE TEST (χ^2)
2. 2 x 2 Table analysis

การตรวจ HBsAg และ Anti-HBs ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ

ใช้น้ำยา GPO One Step ELISA Kit ขององค์การเภสัชกรรม โดยนำ microplate ออกจากถุง แล้วล้างด้วย dilute wash buffer หลุมละ 400 μ l ซับให้แห้ง โดยการคว่ำ plate ลงบนกระดาษซับ ตัวอย่างตรวจและ control ต้องเขย่าก่อนใช้ หลุม A1 และ B1 ใช้เป็น "Blank" ไม่ ต้องใส่ตัวอย่างตรวจลงไป เติมนegative control ในหลุม C1, D1 และ E1 หลุมละ 50 μ l เติมนegative control ใน หลุม F1, G1 หลุมละ 50 μ l เติมตัวอย่างตรวจจำนวน 50 μ l ในหลุมเริ่มต้นที่ H1 เป็นต้นไป เติมนegative conjugate solution จำนวน 50 μ l ลงในแต่ละหลุม ยกเว้น Blanks ใช้ Plate cover ปิด microplate หลังจากนั้นเคาะเบา ๆ ที่ข้าง plate เพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากันดี แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดึง plate cover ออกทิ้ง ล้าง microplate ด้วย diluted wash buffer หลุมละไม่น้อยกว่า 400 μ l จำนวน 5 ครั้ง คว่ำ microplate ลงบนกระดาษซับให้แห้ง เติมนegative substrate solution (substrate solution A + substrate solution B 1 : 1) ลงทุกหลุม หลุมละ 100 μ l นำไปไว้ในที่มืดที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมนegative stop solution ทุก หลุม หลุมละ 100 μ l วัดค่า absorbance ที่ 450 nm ภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเติมนegative stop solution ปริมาณ ความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ HBsAg โดยอ่านผลเปรียบเทียบกับค่าตัดสิน (cut off value)^{19,20}

การตรวจ HBsAg ด้วยน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

ใช้น้ำยา cobas core HBsAg II EIA ของบริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์ จำกัด โดยวิธีการใช้เครื่องตรวจ ELISA รุ่น Cobas Core I ให้เป็นไปตามคู่มือการใช้งาน และบำรุงรักษาเครื่องตรวจ ELISA รุ่น Cobas Core I โดยก่อนและหลังใช้เครื่องต้องทำการบำรุงรักษาประจำวัน ทุกครั้ง นอกจากนั้นต้องทำการบำรุงรักษาประจำสัปดาห์ และประจำเดือนด้วย โดยจดบันทึกไว้ใน Short Guide for Cobas Core I Maintenance ตามที่บริษัทผู้ผลิต แนะนำ ปริมาณความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรง กับปริมาณ HBsAg โดยอ่านผลเปรียบเทียบกับค่าตัดสิน (cut off value)²¹

การตรวจ Anti-HBs ด้วยน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

ใช้น้ำยา cobas core Anti-HBs Quant EIA II ของบริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์ จำกัด วิธีการทำเหมือนกับการตรวจ HBsAg โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะเป็น สัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ Anti-HBs ในสิ่งส่งตรวจ ซึ่งสามารถเทียบหาความเข้มข้นโดยอ่านเทียบกับ กราฟมาตรฐาน ถ้าความเข้มข้น ≥ 10 IU/1 ถือว่าผล Anti-HBs เป็น positive²²

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างซีรัมจำนวน 356 ราย ตรวจพบ

HBsAg โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ 71 ราย และน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ 73 ราย และจาก ตัวอย่างซีรัมจำนวน 303 ราย ตรวจพบ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ 90 ราย และ น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ 91 ราย ดังตารางที่ 1 ซึ่ง อัตราการตรวจพบ HBsAg และ Anti-HBs ของชุดน้ำยา ดังกล่าวแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ผลลบปลอม (false negative) ผลบวกปลอม (false positive) และความแม่นยำ (accuracy) ของการตรวจ HBsAg และ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วย น้ำยาที่ผลิตในประเทศ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาที่นำเข้า จากต่างประเทศ ดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

เปรียบเทียบผลการตรวจ Anti-HBs เชิงปริมาณที่ ตรวจโดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่น้ำยาที่ผลิตในประเทศ สามารถ ตรวจแล้วให้ผลบวกคือ 15.9 IU/1 ดังตารางที่ 4

ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติทั่วไป ของชุดน้ำยา ตรวจ HBsAg และ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ ผลิตในประเทศ กับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ ในเรื่อง เกี่ยวกับขนาดบรรจุ ราคา ปริมาณตัวอย่างตรวจ ระยะ เวลาที่ใช้ตรวจ หลักการทำงาน การควบคุมคุณภาพ และ ความยากง่ายของการทดสอบ ดังตารางที่ 5 และ 6 ตาม ลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการตรวจ HBsAg และ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตโดยน้ำยาที่ผลิตในประเทศและน้ำยาที่ นำเข้าจากต่างประเทศ

ผู้ผลิต / Tests	HBsAg			Anti-HBs		
	total	+	-	Total	+	-
น้ำยาที่ผลิตในประเทศ	356	71	285	303	90	213
น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ	356	73	283	303	91	212

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจ HBsAg โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ กับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

น้ำยาที่ผลิตในประเทศ		น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ		รวม
		+	-	
+		70	1	71
-		3	282	285
รวม		73	283	356
Sensitivity, % = $\frac{70}{73} \times 100 = 95.9$				
Specificity, % = $\frac{282}{283} \times 100 = 99.6$				
False negative, % = $\frac{3}{73} \times 100 = 4.1$				
False positive, % = $\frac{1}{283} \times 100 = 0.4$				
Accuracy, % = $\frac{352}{356} \times 100 = 98.9$				

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการตรวจ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ กับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

น้ำยาที่ผลิตในประเทศ		น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ		รวม
		+	-	
+		84	6	90
-		7	206	213
รวม		91	212	303
Sensitivity, % = $\frac{84}{91} \times 100 = 92.3$				
Specificity, % = $\frac{206}{212} \times 100 = 97.2$				
False negative, % = $\frac{7}{91} \times 100 = 7.7$				
False positive, % = $\frac{6}{212} \times 100 = 2.8$				
Accuracy, % = $\frac{290}{303} \times 100 = 95.7$				

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการตรวจ Anti-HBs โดยวิธี ELISA เชิงปริมาณ ด้วยน้ำยาที่ผลิตโดยน้ำยานำเข้าจากต่างประเทศ กับน้ำยาเชิงคุณภาพที่ผลิตในประเทศ

Quantitative analysis (IU/l)	Qualitative analysis	
	น้ำยานำเข้าจากต่างประเทศ*	น้ำยาที่ผลิตในประเทศ
≥ 1,000	+	+
883.6	+	+
642.7	+	+
418.8	+	+
223.4	+	+
104.1	+	+
86.7	+	+
62.6	+	+
47.4	+	+
19.1	+	+
18.6	+	+
17.9	+	+
16.5	+	+
15.9	+	+
13.2	+	-
12.3	+	-
8.5	-	-
6.9	-	-
3.8	-	-
1.5	-	-
0	-	-

* Cut off ≥ 10 IU/l

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบคุณสมบัติทั่วไปของชุดน้ำยาตรวจ HBsAg โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศกับน้ำยา
ที่ผลิตโดยน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

ข้อเปรียบเทียบ	น้ำยาที่ผลิตในประเทศ	น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ
ขนาดบรรจุ (tests)	96	100
ราคา /กล่อง (บาท)	2,700	5,136
ราคา /tests (บาท)	28.125	51.36
ตัวอย่างตรวจ	Serum หรือ Plasma	Serum หรือ Plasma
ปริมาณตัวอย่างตรวจ (µl)	50	200
ระยะเวลาที่ใช้ตรวจ (นาที)	150	105
หลักการทำงาน	Batch	Batch, Random, Stat
การควบคุมคุณภาพ		
- O.D ของ Negative control	หาค่า blank ควร < 0.100	- 0.005 ถึง 0.030
- O.D ของ Positive control	หาค่า blank ควร > 0.500	- 0.100 - 0.300
- ผลต่าง O.D ของ control	ควร > 0.400	-
ความยากง่ายของการทดสอบ	ยากกว่า	ง่ายกว่า

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบคุณสมบัติทั่วไปของชุดน้ำยาตรวจ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศกับน้ำยา
ที่ผลิตโดยน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

ข้อเปรียบเทียบ	น้ำยาที่ผลิตในประเทศ	น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ
ขนาดบรรจุ (tests)	96	100
ราคา /กล่อง (บาท)	2,700	8,025
ราคา /tests (บาท)	28.125	80.25
ตัวอย่างตรวจ	Serum หรือ Plasma	Serum หรือ Plasma
ปริมาณตัวอย่างตรวจ (µl)	50	150
ระยะเวลาที่ใช้ตรวจ (นาที)	150	75
หลักการทำงาน	Batch	Batch, Random, Stat
การควบคุมคุณภาพ		
- O.D ของ Negative control	หาค่า blank แล้วควร < 0.100	-
- O.D ของ Positive control	หาค่า blank แล้วควร > 0.400	-
- ผลต่าง O.D ของ control	ควร > 0.300	-
- Kit control	-	156 ± 30 IU/l
ความยากง่ายของการทดสอบ	ยากกว่า	ง่ายกว่า

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบการตรวจ HBsAg และ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศซึ่งเป็นน้ำยาใหม่ กับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ โดยสุ่มเลือกตัวอย่างซีรัมจากห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาและงานธนาคารเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลนครปฐม ปรากฏว่าจากตัวอย่างซีรัมจำนวน 356 ราย ผลการตรวจ HBsAg เป็นบวก ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ จำนวน 71 ราย และน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 73 ราย และเมื่อนำตัวอย่างซีรัมจำนวน 303 ราย มาตรวจหา Anti-HBs พบว่าให้ผลบวกด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ จำนวน 90 ราย และน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 91 ราย ซึ่งการตรวจพบ HBsAg และ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ และน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ผลการตรวจ HBsAg โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความไวร้อยละ 95.9 ความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 99.6 ทำให้เกิดผลลบปลอมร้อยละ 4.1 ผลบวกปลอมร้อยละ 0.4 และมีความแม่นยำร้อยละ 98.9 ดังนั้นน้ำยาตรวจไวรัสตับอักเสบบี ที่ผลิตในประเทศ มีโอกาสให้ผลผิดพลาดเพียงร้อยละ 1.1 เท่านั้น

ผลการตรวจ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่ามีความไวร้อยละ 92.3 ความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 97.2 แสดงว่ามีโอกาสเกิดผลลบปลอมร้อยละ 7.7 และผลบวกปลอมร้อยละ 2.8 และมีความแม่นยำร้อยละ 95.7 ดังนั้นน้ำยาตรวจภูมิต้านทานไวรัสตับอักเสบบี ของน้ำยาที่ผลิตในประเทศมีโอกาสนำให้ผลผิดพลาดร้อยละ 4.3 และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ คือ 15.9 IU/l

ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติทั่วไปของชุดน้ำยาตรวจ

HBsAg และ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ด้วยน้ำยาที่ผลิตในประเทศ กับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่าน้ำยาที่ผลิตในประเทศ มีราคา/test เป็นร้อยละ 54.8 และ 35.0 ของน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ ตามลำดับ ใช้ตัวอย่างตรวจน้อยกว่า 4 และ 3 เท่าตามลำดับ แต่ใช้เวลาในการตรวจมากกว่า 1.4 และ 2 เท่าตามลำดับ ในการตรวจต้องทำเป็นชุด ๆ ในขณะที่น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศสามารถตรวจเป็นชุด เป็นรายตัวอย่าง และตรวจแบบด่วนได้ด้วย ส่วนการควบคุมคุณภาพมีการกำหนดค่า O.D. ของ Control ให้อยู่ในช่วงค่าที่กำหนดไว้เหมือนกัน ยกเว้นการตรวจ Anti-HBs ซึ่งปริมาณ ต้องทำ Kit control ไม่ให้เกินช่วงค่าที่กำหนดไว้

สรุป

ชุดน้ำยาตรวจ HBsAg และ Anti-HBs โดยวิธี ELISA ของน้ำยาที่ผลิตในประเทศ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศแล้ว จะเห็นได้ว่าถึงแม้ว่าน้ำยาที่ผลิตในประเทศนั้นมีความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำต่ำกว่า น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ แต่ความแตกต่างนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจดีพอที่จะนำมาใช้ทดแทนน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศได้ แต่น้ำยาตรวจ HBsAg มีโอกาสเกิดผลลบปลอมได้ร้อยละ 4.1 และผลบวกปลอมร้อยละ 0.4 และน้ำยาตรวจ Anti-HBs มีโอกาสเกิดผลลบปลอมร้อยละ 7.7 และผลบวกปลอมร้อยละ 2.8 ดังนั้นหากผลการตรวจไม่สอดคล้องกับอาการหรือประวัติของผู้ป่วย ควรที่จะทำการตรวจซ้ำด้วยน้ำยาของบริษัทอื่น หรือตรวจโดยวิธีอื่น ๆ ที่มีความไว และความจำเพาะมากกว่าเพื่อเป็นการยืนยันด้วย เมื่อพิจารณาในด้านราคาจะเห็นได้ว่าน้ำยาตรวจ HBsAg และ Anti-HBs ของน้ำยาที่ผลิตในประเทศมีราคา/test เป็นร้อยละ 54.8 และ 35.0 ของน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศตามลำดับ หากนำน้ำยานี้มาทดแทนน้ำยาจากต่างประเทศจะทำให้ลดการนำเข้า และลดต้นทุนในการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้มาก แต่ในด้านความ

สะดวกในการใช้งานนั้น แม้ว่าน้ำยาที่ผลิตในประเทศจะ
ใช้ตัวอย่าง ตรวจน้อยกว่า 3-4 เท่าก็ตาม แต่ใช้เวลาใน
การตรวจมากกว่า 1.4-2.0 เท่า และต้องรวบรวมตัวอย่าง
ตรวจให้มากพอที่จะทำการตรวจพร้อมกันเป็นชุด อย่างไร
ก็ตาม เมื่อพิจารณาในด้านประสิทธิภาพ และราคาของ
น้ำยาที่ผลิตในประเทศแล้ว น้ำที่จะนำมาใช้ทดแทนน้ำยา
ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศได้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนที่ใช้
ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และลดมูลค่าการสูญเสีย
เงินตราให้กับต่างประเทศ แต่อาจมีการพัฒนาน้ำยาให้มี
ความไว ความจำเพาะ และความสะดวกในการใช้งานให้
มากขึ้นต่อไป

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจแต่ละตัวอย่างเพียง
ครั้งเดียว อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้บ้าง ดังนั้นเพื่อให้
ได้ผลการศึกษามี ความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือมาก
ยิ่งขึ้น จึงควรที่จะทำการตรวจแต่ละตัวอย่างอย่างน้อย
ตัวอย่างละ 2 ครั้ง (duplicate) หรือใช้เจ้าหน้าที่ 2 คน ทำ
การตรวจตัวอย่างเดียวกันแล้วนำผลมาเปรียบเทียบกัน
นอกจากนี้อาจเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นด้วย สำหรับ
การเปรียบเทียบการตรวจ Anti-HBs เซึ่งปริมาณด้วยน้ำ
ยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ กับน้ำยาเชิงคุณภาพของน้ำ
ยาที่ผลิตในประเทศนั้น ไม่สามารถกำหนดความเข้มข้น
ตามที่ต้องการได้เนื่อง จากการเป็นการเปรียบเทียบปริมาณ
Anti-HBs ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่นำมาศึกษาครั้งนี้
ดังนั้นหากต้องการทราบความเข้มข้นของ Anti-HBs ต่ำ
สุดที่น้ำยาที่ผลิตในประเทศสามารถตรวจได้จะต้องมีสาร
มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นของ Anti-HBs หลาย ๆ
ระดับ เพื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบต่อไป จึงจะสามารถ
นำค่าดังกล่าวไปอ้างอิงได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนน้ำยาจากองค์
การเภสัชกรรม และบริษัท โรชไดเอกโนสติกส์ จำกัด และ
ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุพรรณิ ศานติวิชัย ภาค
วิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย

ยาลัทยมิตดล กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และช่วยแก้ไข
รายงานผลการศึกษา คุณนันทิ รื่นกลิ่น กองการตลาด
องค์การเภสัชกรรม ช่วยติดต่อประสานงานเกี่ยวกับชุด
น้ำยา

เอกสารอ้างอิง

1. สิริฤกษ์ ทรงศิริวิไล. เชื้อไวรัสตับอักเสบบี. ใน
สิริฤกษ์ ทรงศิริวิไล. บรรณาธิการ. ดัปกอักเสบบีจาก
ไวรัส (Viral Hepatitis), คณะแพทยศาสตร์ศิริราช
พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุ-
เทพฯ บางกอกบลิ๊ก 2543 37-75.
2. Thongcharon P, Panpatana P, Wasi C, et al. The ince-
dence of hepatitis B surface in tropical infectious and
liver diseases in Thailand. J Med Assoc. Thai 1976
59 546-9.
3. อำนาจ ศรีรัตนบัลล์, ดนัย ด้านวิวัฒน์, เสรี สุกแสง
ฉาย, ไหม รัตนวรารักษ์, นุชบา มาตระกูล. การ
ศึกษาความชุกของโรคตับในชุมชนชนบทแห่งหนึ่งทาง
ภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย. จุฬาลงกรณ์เวชสาร
2526 27 393-401.
4. Punyagupta S, Olaon IC, Harinasuta V, Akarawong K
Var. awidhys W. The epidermiology of hepatitis B
antigen in high prevalence area. Am J Epidemiol
1973 97 349-54.
5. เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล. คินีนาฐ สนิทพงษ์. อุปติการ
ของโรคเริมในประเทศไทย, ปี พ.ศ. 2522. วารสาร
โรคเริม 2525 8 127-34.
6. วิญญู สุชาติล้ำพงศ์, กิจเกษม จินดา, ทินรัตน์
สถิตินิมานการ. การศึกษาเริมออกชนิดร้ายแรงโดย
การตรวจศพ. วารสารโรคเริม 2521 4 63-70.
7. Chinwiseswong T. Detection of HBV by use PCR.
[The degree of Master of science (biochemistry)].
Bangkok : Faculty of Graduate studies Mahidol
University; 1991.

8. สุดา ลุยศิริโรจนกุล. วิธีตรวจไวรัสตับอักเสบ. ใน รวงผึ้ง สุทนต์, จันทพงษ์ วะสี บรรณาธิการ. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการไวรัส. กรุงเทพฯ โรงพิมพ์อักษรสมัย 2535 43-5.
9. นภาพร บานชื่น. การตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี. ใน สุทธิพันธุ์ สารสมบัติ บรรณาธิการ. อิมมูโนวิทยา. กรุงเทพฯ 167-76 186-87.
10. Bryont NJ. Viral hepatitis. In : Bryont NJ editor. Laboratory immunology and serology. 2nd ed. Philadelphia : W.B. Saunders ;1986 93-8.
11. สุดา ลุยศิริโรจนกุล. วิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับ Viral hepatitis. ใน คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล บรรณาธิการ. คู่มือการศึกษาทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา. กรุงเทพฯ 2529 33-4.
12. นิลวรรณ พิษณุโยธิน. การตรวจวิเคราะห์ไวรัสตับอักเสบนิตปี โดยวิธีอีไลซ่า. ใน ภาควิชา เทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ชมรมเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยบรรณาธิการ. LAB : HIV, HBV & RABIES VIRUS ; 19-20 พ.ย. 2530 ห้องประชุมตึกอบรมวิชา การ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2530 ; A1-20.
13. อรุณศรี โคตะสิน. การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ระหว่างวิธี ELISA RPHA และ Dip Stick (Comb) [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การบริการ โฉมใหม่]. กรุงเทพฯ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยมหิดล 2539.
14. สุดา ลุยศิริโรจนกุล. การวินิจฉัยโรคตับอักเสบจากไวรัสทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน. ใน สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล บรรณาธิการ. ตับอักเสบบีจากไวรัส. กรุงเทพฯ 2543 344-45.
15. Chaturachumroenchai S. Detection of HBV genome by gene amplification method in HBsAg negative blood donors [The degree of Master of Science (clinical Pathology)]. Bangkok : Faculty of Graduate studies Mahidol University ; 1998.
16. Louisirirothanakul S, Wasi C, Sakulkoo P, and Thongcharen P. Sensitivity of ELISA and hemagglutination test for hepatitis B markers. J Med Ass Thailand 1986 69 279-82.
17. ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ, สุจริต วังคะฮาด และ ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์ การเปรียบเทียบความไวระหว่างวิธี ELISA และ Hemagglutination ในการตรวจ HBV markers ผลการวิจัยไม่ตีพิมพ์ 2529.
18. วิมล สุขธมยา, มาลิดา พรพัฒน์กุล, พิเศษพงษ์ ปัทมะสุนทร, สหวัฒน์ ว่องเจริญพืชผล และมนรัตน์ กันตังกุล. การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหา Hepatitis B surface antigen โดยวิธี EIA และ RPHA. สงขลา นครินทร์เวชสาร 2530 25 65-70.
19. องค์การเภสัชกรรม กระทรวงสาธารณสุข เอกสารประกอบการใช้ชุดน้ำยาตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (GPO One Step ELISA Kit for HBsAg Detection), 2546.
20. องค์การเภสัชกรรม กระทรวงสาธารณสุข เอกสารประกอบการใช้ชุดน้ำยาตรวจภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (GPO One Step ELISA Kit for Anti-HBsAg Detection), 2546.
21. Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim : Cobas Core HBsAg II EIA leaflet, 2002.
22. Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim : Cobas Core Anti-HBs Quant EIA II leaflet, 2002.