วารสารแพทย์เขต 7
ปีที่ 9 ฉบับที่ 3 ก.ย. - ธ.ค. 2533
นิพนธ์ต้นฉบับ
Region 7 Medical Journal
Vol.9 No.3 Sep. - Dec. 1990

COMPARISON OF CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN BY TWO TEST METHODS

เรขวรรณ เรขะคณะกุล วท.บ.(เทคนิคการแพทย์), สส.บ.
(บริหารสาธารณสุข)*

Abstract : Comparison of Carcinoembryonic Antigen by Two Test Methods.
Reka-kanakul R.
Department of Clinical Pathology, Nakornpathom Hospital, Thailand..
Reg 7 Med J 1990 ; 9 : 141-147

Thirty patient serum samples were assayed for carcinoembryonic antigen by radioimmunoassay and enzyme immunoassay. The samples had carcinoembryonic antigen values ranging from approximately 1 to 35 ng/ml. The two test had positive correlation. (r = 0.98)

เรื่องย่อ : การตรวจหา carcinoembryonic antigen โดยวิธี radioimmunoassay และ enzyme immunoassay ในน้ำเหลืองผู้ป่วย จำนวน 30 คน ให้ค่าตั้งแต่ประมาณ 1 ถึง 35 นาโนแกรมต่อมิลลิลิตร ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันในทางบวก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.98

* กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิค โรงพยาบาลนครปฐม นครปฐม 73000

บทนำ

ในปี 1965 Gold และ Freedman ได้พบโปรตีนชนิดหนึ่งของเนื้อเยื่อมะเร็งจาก colon carcinoma นอกจากนั้นยังสามารถพบได้ในลำไส้ ตับ และตับอ่อนของตัวอ่อนที่มีอายุประมาณ 2-6 เดือน ดังนั้น จึงได้ตั้งชื่อโปรตีนนี้ว่า carcinoembryonic antigen (CEA)

CEA เป็นไกลโคโปรตีนที่ละลายได้ในกรด perchloric Krupey และคณะ ได้สกัด CEA จากเนื้อเยื่อเซลล์มะเร็งโดยวิธี immunodiffusion แต่วิธีนี้ไม่สามารถตรวจหาในเลือดได้ เนื่องจากมีปริมาณในน้ำเหลืองน้อยมาก (คนปกติมีไม่เกิน 2.5 นาโนแกรม ต่อ มิลลิลิตร) ต่อมาจึงมีการพัฒนาวิธีตรวจวัดโดยวิธี radioimmunoassay (RIA) และ enzyme immunoassay (EIA) ตามลำดับ

วัตถุประสงค์

เนื่องจากการตรวจ CEA ใช้ในการติดตามการรักษาของผู้ป่วย ไม่ใช้ในการตรวจแยกผู้ป่วยโรคมะเร็ง ดังนั้นผู้เขียนจึงสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของค่า CEA โดยวิธี RIA และ EIA เพื่อเป็นแนวทางให้ห้องปฏิบัติการในการเลือกใช้น้ำยาสำเร็จรูป

วัสดุและวิธีการ

1. น้ำยาตรวจ CEA โดยวิธี RIA ยี่ห้อ Diagnostic Product Corporation (DPC), calalog number KCED 1 (100 tube), lot 242, exp. 07-31-90

2. น้ำยาตรวจ CEA โดยวิธี EIA ยี่ห้อ Roche 100 tests, Ch B, lot R 2138, exp. 03-91

3. น้ำเหลืองผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ จำนวน 30 ราย

การทดลอง

1. ทำ calibration curve ของน้ำยา 2 ชนิด ชนิดละ 2 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ เพื่อดูว่าในการทดลองแต่ละครั้งจำเป็นต้องทำ curve ทุกครั้งหรือไม่

2. ทำการตรวจหาค่า CEA ในน้ำเหลืองผู้ป่วยจำนวน 30 ราย นำค่าที่ได้มา plot ลงในกราฟเพื่อดูความสัมพันธ์ นำค่าทั้งหมดมาคำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

ในการทดลอง จะต้องทำเป็นคู่ (duplicate) และปฏิบัติตามข้อแนะนำของแต่ละบริษัท

การตรวจ CEA โดยวิธี RIA (DPC)

หลักการ

เป็น double antibody CEA ที่ติดฉลากด้วย 125 I จะแย่งจับ antibody site กับ CEA ในน้ำเหลืองผู้ป่วยในช่วง second incubation หลังจากนั้น antibody ที่อยู่ในรูป bound form จะถูกตกตะกอน และนำมาวัดปริมาณรังสี

ในการตกตะกอน บริษัทแนะนำให้ใช้เครื่องปั่นเย็น (refrigerated centrifuge) ที่มีความเร็ว 3,000 G ปั่นนาน 15 นาที แต่การทดลองนี้ใช้เครื่องปั่นตกตะกอนที่มีความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (rpm) ปั่นนาน 20 นาที โดยคำนวณจากสูตร

G force = 28.38 × (rpm/1000) × radius (inches)

การคำนวณ

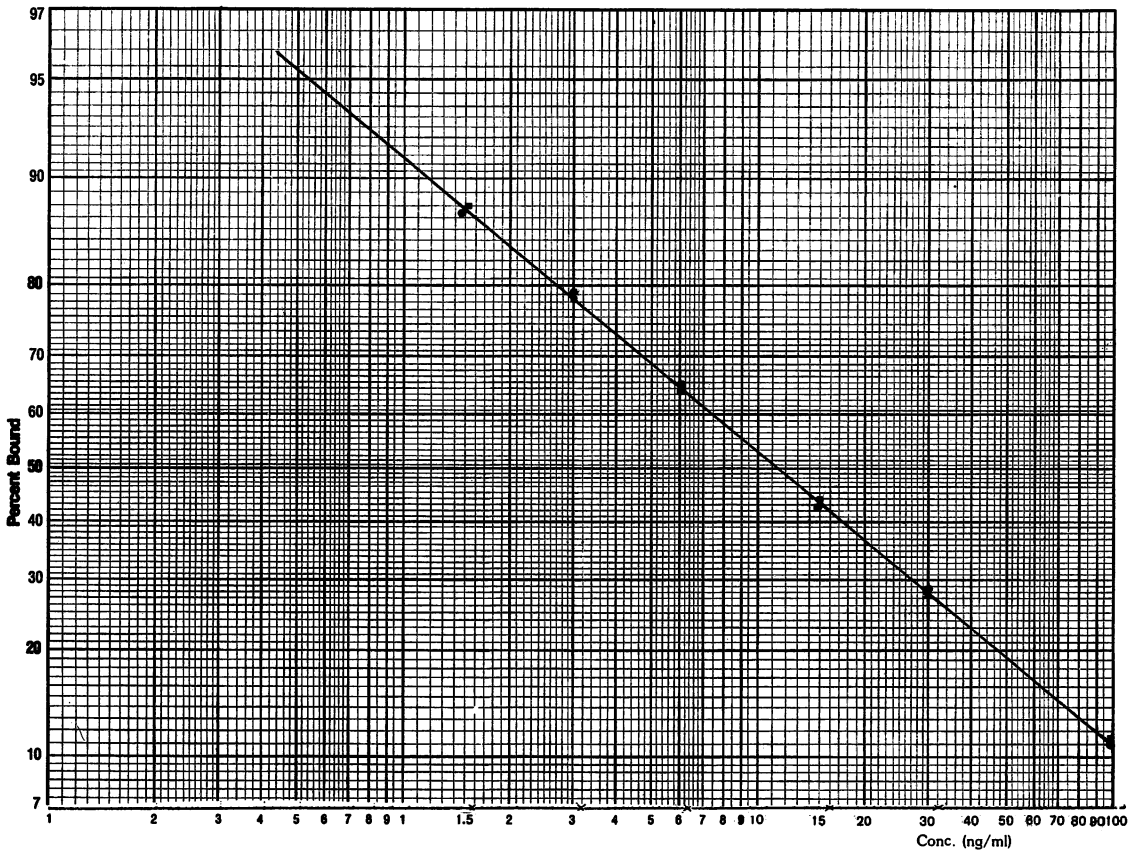
การคำนวณค่า CEA จากค่า count per minute (cpm) โดยนำค่าเฉลี่ยของ nonspecific binding (NSB) หักจากค่าเฉลี่ยของ CPM

Net count = Average CPM-Average NSB

จากนั้นนำมาคำนวณค่า percent bound โดยให้ค่าเฉลี่ยของ maximum binding (MB) ที่หักด้วยค่าเฉลี่ยของ NSB แล้ว มีค่าเป็น 100%

Percent bound = Net count/Net MB count × 100

ใช้กระดาษ logit-log พลอต percent bound ในแกนตั้ง และความเข้มข้นในแกนนอน (ดังรูปที่ 1)



Quality control parameters	*ครั้งที่ 1*	*ครั้งที่ 2*	*หน่วย*
Total count (average)	*24103*	*21413*	*CPM*
% MB (maximum binding)	*24.44*	*23.51*	*%*
% NSB (nonspecific binding)	*0.67*	*0.65*	*%*
20% intercept	*48.0*	*48.0*	*ng/ml*
50% intercept	*11.5*	*11.8*	*ng/ml*
80% intercept	*2.7*	*2.8*	*ng/ml*

รูปที่ 1 *Calibration curve CEA วิธี RIA*
- ● *ครั้งที่ 1*
- ■ *ครั้งที่ 2*

การตรวจ CEA โดยวิธี EIA (Roche)

หลักการ

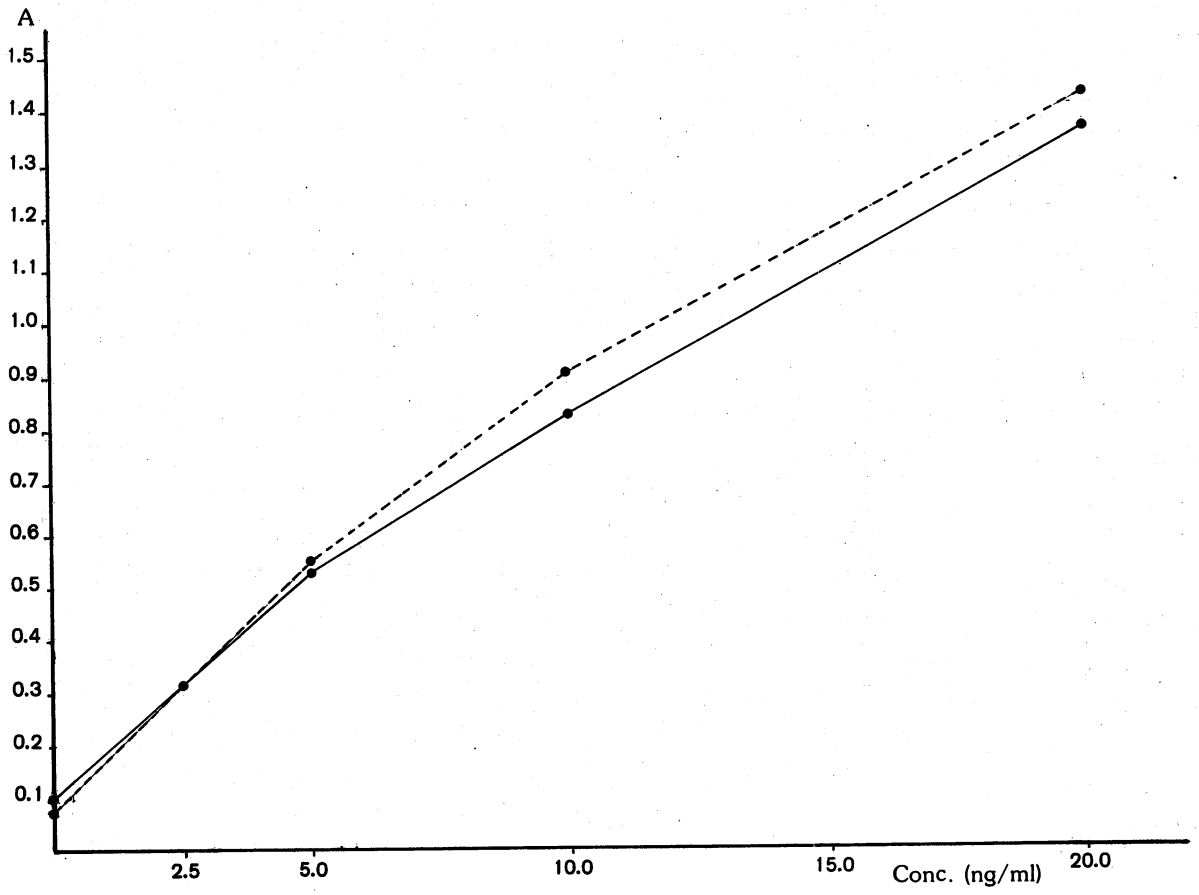
เป็น solid phase enzyme immunoassay โดยหลักการ sandwich CEA จับกับ monoclonal anti-CEA (coated bead) และ anti-CEA peroxidase เติมsubstrate เพื่อให้เกิดสี ความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกริยาของ enzyme วัดโดย photometer ที่ 492 nanometre (nm.)

การหาค่า CEA

photometer ของบริษัทสามารถคำนวณค่า CEA โดยอัตโนมัติจากstandard curve หากไม่มีเครื่อง EIA-photometer ก็ยังสามารถนำค่ามาพลอตบนกระดาษกราฟ โดยค่า absorbance (A) เป็นแกนตั้ง และค่าความเข้มข้นเป็นแกนนอน ดังรูปที่ 2

ในการตรวจหา CEA ในน้ำเหลืองผู้ป่วย 30 ราย ด้วยวิธี RIA และ EIA ให้ผลดังตารางที่ 1

นำค่า CEA ที่ได้ทั้งหมดมาพลอตกราฟ โดยให้ค่า CEA (RIA) อยู่ในแกนตั้ง และค่า CEA (EIA) อยู่ในแกนนอน ดังรูปที่ 3



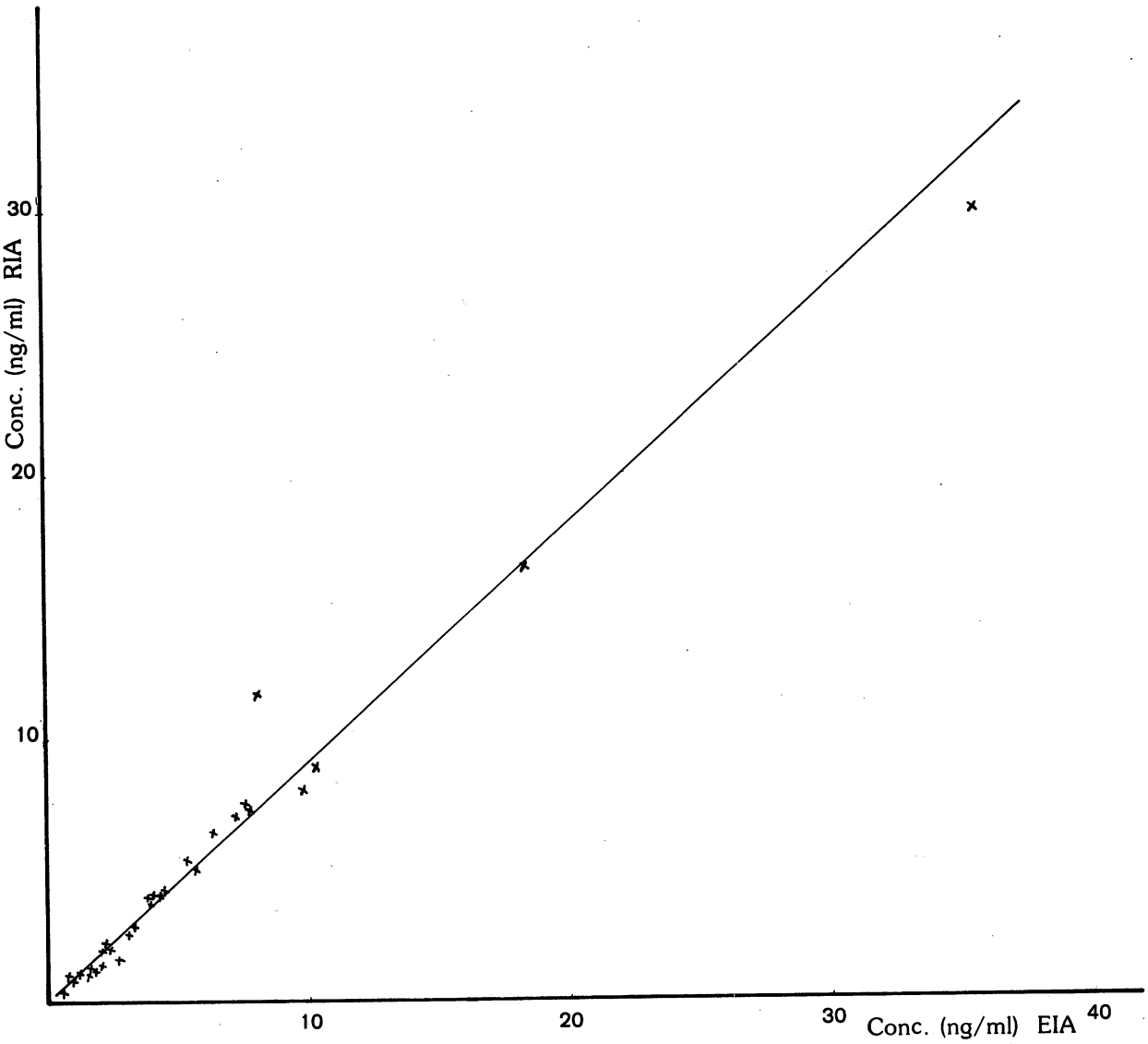
รูปที่ 2 *Calibration curve CEA วิธี EIA*

..... *ครั้งที่ 1*

_____ *ครั้งที่ 2*

ตารางที่ 1 *แสดงค่า CEA ในผู้ป่วย 30 ราย ด้วยวิธี RIA และ EIA*

ลำดับตัวอย่าง	ค่า CEA (ng/ml)	
	RIA	EIA
1	30.0	35.78
2	9.0	10.34
3	1.15	1.044
4	1.5	2.13
5	7.4	7.83
6	11.8	8.18
7	1.3	1.81
8	1.3	1.917
9	5.5	5.543
10	2.7	3.183
11	2.1	2.514
12	2.3	2.348
13	3.0	3.483
14	1.7	2.823
15	0.97	1.141
16	0.52	0.702
17	1.25	1.792
18	1.2	1.459
19	7.1	7.368
20	6.5	6.431
21	7.6	6.431
22	16.5	18.42
23	4.2	4.144
24	4.3	4.824
25	4.0	4.005
26	2.0	2.237
27	4.3	4.673
28	4.0	3.969
29	4.1	4.378
30	8.1	9.944



รูปที่ 3 *เปรียบเทียบค่า CEA ที่ได้จากวิธี RIA และ EIA*

การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)

$$r = \frac{\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)/n}{\sqrt{\left[\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2/n\right]\left[\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2/n\right]}}$$

$$= 0.9868$$

Σx = *ผลรวมของค่า CEA วิธี RIA*

Σy = *ผลรวมของค่า CEA วิธี EIA*

n = *จำนวนขนาดตัวอย่าง*

วิจารณ์

จากการทดลองและนำค่า CEA ที่ได้ทั้งสองวิธีมาหาความสัมพันธ์ จะเห็นได้ว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันในทางบวก (positive correlation) โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9868 ดังนั้นการจะใช้วิธีใดก็ให้ผลดีเช่นกัน ผู้เขียนใคร่เสนอความคิดเห็นดังนี้

1. เครื่องมือ

จะเห็นได้ว่าการตรวจ CEA ทั้งสองวิธีจะต้องมีเครื่องมือประกอบ โดยวิธี RIA จะต้องมีเครื่องตรวจวัดรังสี (gamma counter) และเครื่องปั่นเย็น (refrigerated centrifuge) หรือเครื่องปั่นตกตะกอนที่มีความเร็วไม่ต่ำกว่า 3,000 รอบต่อนาที ส่วนวิธี EIA จะต้องมีเครื่องล้าง (washer) และ photometer ที่มีฟิลเตอร์ 492 nm.

2. ขั้นตอนในการทำและระยะเวลาในการทำ

วิธี RIA มีขั้นตอนมากกว่า แต่ใช้เวลาน้อยกว่า (ประมาณ 5-6 ชม.) ช่วงเวลาตรวจวัดรังสี หากมีจำนวนมากจะใช้เวลานานขึ้น (หลอดละ 1 นาที)

วิธี EIA มีขั้นตอนน้อยกว่า แต่ใช้เวลานานกว่า (ประมาณ 24 ชม.) เมื่อหยุดปฏิกริยาจะต้องรีบวัด จากการทดลองโดยทิ้งไว้นานราว 30 นาทีนำมาวัดเปรียบเทียบก็ยังให้ค่าคงที่ แต่ถ้าทิ้งไว้นานกว่านี้สีจะเข้มขึ้น

3. การทำ calibration curve

ควรทำ calibration curve ควบคู่ control ทุกครั้ง จากการทำ curve ห่างกัน 1 สัปดาห์พบว่า วิธี RIA ให้ค่า count ที่ลดลง ในขณะที่วิธี EIA ให้ slope ที่ต่ำลง

4. น้ำยาตรวจ CEA

วิธี RIA มีอายุการใช้งานค่อนข้างสั้น (ประมาณ 2 เดือน) แต่มีช่วงวัดที่กว้าง (0-100 ng/ml) ส่วนวิธี EIA มีอายุการใช้งานยาวกว่า (ประมาณ 8-10 เดือน) แต่มีช่วงวัดแคบกว่า (0-20 ng/ml)

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าทั้งสองวิธีมีข้อได้เปรียบเสียเปรียบพอ ๆ กัน การจะเลือกใช้วิธีใดนั้นควรคำนึงถึงความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ บริษัทแอล แอนด์ อาร์ เอ็นเตอร์ไพรส์ และบริษัท ดีทแฮล์ม จำกัด (โรช) ที่เอื้อเฟื้อน้ำยาตรวจสำเร็จรูป CEA ตลอดจนความร่วมมือในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. **Sonnenwirth AC, Leonard J. Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. USA : The C V Mosby Company, 1980.**
2. **Sriratanakul P, Sukvirach S. Carcinaembryonic antigen in cancer patients. Thai Cancer J 1980 ; 5 : 155-165.**
3. **Limsila T, Srivatanakul P, Sarasombath S. Role of carcinoembryonic antigen (CEA) in the diagnosis and management of bronchial, brest and gastro-intestinal carcinoma. Thai Cancer J 1985 ; 10 : 38-44.**
4. **เติมศรี ชำนิจารกิจ. สถิติประยุกต์ทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2527 : 273-293.**