

การประเมินผลการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี โดยวิธีการตรวจ Anti-HCV และ HCV Core Antigen Evaluation of Hepatitis C Virus Infection Analysis by Anti-HCV and HCV Core Antigen Assays

สุลินดา ดามะอุ*, วราภรณ์ ฟักโพธิ์ และชนากานต์ ปัญญาวานันท์

ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ฐิติมนรัตน์ ดวงจันทร์ดา

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Sulinda Dama-u*, Waraphorn Fukpho and Chanakan Phanyawan

Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital,

Khleng Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120

Thitimonrat Duangchanda

Department of Medical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khleng Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การตรวจ anti-HCV ใช้ในการคัดกรองการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ซึ่งอาจตรวจพบผลบวกปลอมได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่า signal-to-cutoff (S/CO) ratio ที่ถูกต้องและเหมาะสมในการรายงานผล anti-HCV และประเมินผลการตรวจ HCV core Ag ตัวอย่างซีรัม/พลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจ anti-HCV ด้วยวิธี chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) จากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ 169 ตัวอย่าง นำมาตรวจ HCV RNA ด้วยวิธี real-time RT-PCR และตรวจ HCV core Ag โดยค่า signal-to-cutoff (S/CO) ratio ที่เหมาะสมประเมินจาก receiver-operating characteristic (ROC) ระหว่างผลการตรวจ anti-HCV กับ HCV RNA และประเมินความสอดคล้องของผลการตรวจ HCV core Ag และ HCV RNA โดย Cohen's kappa coefficient ผลการวิเคราะห์ ROC พบค่า anti-HCV S/CO ratio ที่ 5.4 ความไว 100 % และความจำเพาะ 93.3 % การตรวจ HCV core Ag เปรียบเทียบกับผลการตรวจ HCV RNA มีความไว ความจำเพาะ ค่า

ทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 98.7, 100, 100 และ 98.9 % ตามลำดับ ผลการตรวจ HCV core Ag มีความสอดคล้องกับผลการตรวจ HCV RNA ในระดับดีมากอย่างมีนัยสำคัญ ($Kappa = 0.988, p < 0.001$) ค่า S/CO ratio คือ 5.4 มีความไวและความจำเพาะเหมาะสมในการตรวจ anti-HCV ส่วนการตรวจ HCV core Ag มีความสอดคล้องกับการตรวจ HCV RNA ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการยืนยันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี

คำสำคัญ : ไวรัสตับอักเสบซี; anti-HCV; HCV core Ag; S/CO ratio

Abstract

Anti-HCV test is widely used for screening of hepatitis C virus infection. The signal-to-cutoff (S/CO) ratio can be used to interpret hepatitis C virus infection; above a certain S/CO ratio value. However, it is likely to be a false positive. The purpose of this study was to determine the optimal anti-HCV signal-to-cutoff (S/CO) ratio and to evaluate the agreement between the HCV core Ag and HCV RNA. The total of 169 leftover serum/plasma samples from anti-HCV screening (chemiluminescence microparticle immunoassay, CMIA) were obtained from Thammasat University hospital. These samples were tested for HCV core Ag and HCV RNA (real-time RT-PCR). A receiver operating characteristic (ROC) curve was applied to determine the optimal signal-to-cutoff (S/CO) ratio by using HCV RNA for detecting hepatitis C virus infection. Cohen's kappa coefficient was used to evaluate the agreement between the HCV core Ag and HCV RNA. The ROC curves analysis showed that the cutoff point of anti-HCV S/CO ratio was 5.4 (sensitivity 100 % and specificity 93.3 %). Both of HCV core Ag and HCV RNA are excellent agreement ($kappa = 0.988, p < 0.001$). In conclusion, the optimal anti-HCV S/CO ratio value is appropriate for screening of hepatitis C virus infection. There is an excellent agreement between HCV core Ag and HCV RNA as a standard method. Therefore, HCV core Ag is a valid and reliable method for confirmation of hepatitis C virus infection

Keywords: hepatitis C virus; anti-HCV; HCV core Ag; S/CO ratio

1. บทนำ

ไวรัสตับอักเสบซี (hepatitis C virus, HCV) ทำให้เกิดภาวะตับอักเสบเรื้อรังและเป็นสาเหตุหลักของมะเร็งตับ ผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบซีทั่วโลกประมาณ 71 ล้านคน โดยผู้ติดเชื้อมักไม่แสดงอาการ และบางรายอาจมีภาวะตับอักเสบเฉียบพลัน ขณะที่ประมาณ 30 % (15-45 %)

ของผู้ติดเชื้อ ร่างกายสามารถกำจัดเชื้อได้เองภายใน 6 เดือนของการติดเชื้อ โดยที่ไม่ได้รับการรักษา และประมาณ 70 % (55-85 %) ของผู้ติดเชื้อกลายเป็นผู้ติดเชื้อเรื้อรัง ซึ่งเพิ่มโอกาสในการเป็นโรคตับแข็ง 15-30 % ภายในระยะเวลา 20 ปี [1] การศึกษาในปี ค.ศ. 1999 พบว่าประชากรทั่วโลกมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีประมาณ 3 % [2] และในช่วงปี ค.ศ. 2000-

2015 ประมาณ 2.5 % หรือ 177.5 ล้านคนทั่วโลก สำหรับประเทศไทย อัตราความชุกของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 2.7 % [3] และพบผู้ติดเชื้อเรื้อรังประมาณ 0.39 % หรือ 356,670 รายทั่วประเทศ [4] การตรวจ anti-HCV ในการคัดกรองผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถพบผลบวกปลอมจากความชุกของการเกิดโรคที่ต่ำ [5] และจากผู้ป่วยกลุ่ม myeloma, rheumatoid factor, liver disease (cirrhosis, cancer), autoimmune disease หรือจากการติดเชื้อไวรัสอื่น ๆ เช่น ไวรัสเอชไอวีและไวรัสตับอักเสบบี [6] การศึกษาความชุกของผลบวกปลอม (false positive) ของการตรวจ anti-HCV โดย National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) ปี ค.ศ. 2007-2012 พบผลบวกปลอมถึง 22 % [5]

การตรวจ anti-HCV ตรวจพบได้ทั้งในผู้ที่กำลังติดเชื้อและผู้ที่เคยติดเชื้อมาก่อน ซึ่งทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยจำแนกความแตกต่างของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มดังกล่าว ส่วนการตรวจเชิงปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี ใช้การตรวจวัดปริมาณของ HCV RNA ด้วยวิธีเรียลไทม์ อาร์ทีพีซีอาร์ (real-time RT-PCR) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจยืนยันผลการตรวจ anti-HCV ที่ให้ผลเป็นบวก อีกทั้งยังใช้ประกอบในการติดตามผลการรักษา [7,8] ส่วนแนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประเทศไทย พ.ศ. 2561 โดยสมาคมโรคตับแห่งประเทศไทยพบว่า ผู้ป่วยที่ตรวจ anti-HCV ในซีรัมแล้วให้ผลบวกควรได้รับการตรวจ HCV core antigen (HCV core Ag) หรือตรวจ HCV RNA ด้วยวิธีที่มีความไวในการตรวจพบ HCV RNA ในเลือดอย่างน้อย 15 IU/mL เพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี กรณีที่ตรวจไม่พบ HCV core Ag หรือ HCV RNA ให้เก็บตัวอย่างเลือดใหม่และตรวจ HCV core Ag หรือ HCV RNA ซ้ำในระยะเวลา 3-6 เดือนถัดมา ซึ่งหากตรวจไม่พบ HCV

core Ag หรือ HCV RNA แสดงว่าเป็นผลบวกปลอม หรือหายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแล้ว จึงควรให้คำแนะนำแก่ผู้ป่วยและไม่ต้องตรวจติดตามต่อไป [9] ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงต้องการประเมินผลการตรวจการติดเชื้อ HCV โดยการหาค่า signal-to-cutoff (S/CO) ratio ที่ถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการรายงานผลการตรวจ anti-HCV ภายในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะประเมินผลการตรวจ HCV core Ag ในตัวอย่างผู้ป่วย เพื่อใช้ในการตรวจยืนยันการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแทนการตรวจ HCV RNA ที่ใช้เวลานานและมีราคาแพง ซึ่งการตรวจ HCV core Ag เป็นการตรวจโดยใช้เครื่องอัตโนมัติและใช้สิ่งส่งตรวจชนิดเดียวกับการตรวจ anti-HCV จึงตรวจได้ภายในเวลาอันรวดเร็วพร้อมกับการตรวจ anti-HCV อีกทั้งยังมีราคาที่ถูกกว่าการตรวจ HCV RNA

2. วิธีการวิจัย

2.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยเป็นตัวอย่างซีรัม/พลาสมาของผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่ไม่พบประวัติการรักษาไวรัสตับอักเสบบี 169 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบบี (anti-HCV) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Architect รุ่น Plus i2000sr (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL) และให้ผลการตรวจเป็นบวกและลบ 125 และ 44 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตัวอย่างซีรัม/พลาสมาที่นำมาตรวจต้องไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) หรือมีปริมาตรน้อยกว่า 1 mL และไม่มีผลการตรวจ anti-HIV เป็นบวก การศึกษาวิจัยครั้งนี้

นี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 3 รหัสโครงการ 096/2562 เมื่อวันที่ 6 กันยายน พ.ศ. 2562

จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ anti-HCV ให้ผลบวก 125 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คำนวณจากข้อมูลความชุกของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั่วโลก ประมาณ 3 % [2] จากสูตร $n = (Z_{\alpha/2}^2 PQ) / d^2$ โดย n = จำนวนตัวอย่าง; α = ความผิดพลาดชนิดที่ 1 (0.05); P = ค่าสัดส่วนของตัวแปรที่สนใจ (0.03); $Q = 1 - P$; d = ค่าความผิดพลาด (0.03)

2.2 การตรวจ Anti-HCV ในตัวอย่างผู้ป่วย

นำตัวอย่างของผู้ป่วยมาตรวจ anti-HCV ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Architect รุ่น Plus i2000sr (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL) ที่ใช้หลักการ chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) โดยออกแบบน้ำยามาเพื่อตรวจแอนติบอดีต่อ fusion protein ที่เกิดจากการตัดแต่งพันธุกรรมให้ผลิตโปรตีนลูกผสมที่ประกอบด้วย c100-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (nonstructural protein) NS3, NS4 และ HCr43 ซึ่งเป็นโปรตีนลูกผสมระหว่างโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (nonstructural protein) NS3 กับโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) Core ของ HCV genome ผลการตรวจอ่านจากค่าอัตราส่วน (ratio) ของหน่วยแสงสัมพันธ์ของตัวอย่าง (signal, S) ต่อหน่วยแสงสัมพันธ์ที่ได้จากการสอบเทียบน้ำยาของเครื่อง (cutoff, CO) หรือ signal-to-cutoff (S/CO) ratio โดยค่าที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1 S/CO ratio อ่านผลเป็นบวก (positive) ส่วนค่าที่น้อยกว่า 1 S/CO ratio อ่านผลเป็นลบ (negative) [10]

2.3 การตรวจ HCV Core antigen ในตัวอย่างผู้ป่วย

การตรวจ HCV core Ag ในตัวอย่างของ

ผู้ป่วยด้วยเครื่องอัตโนมัติ Architect รุ่น Plus i2000sr (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL) ใช้หลักการ CMIA โดยน้ำยามาเป็น microparticle ที่เคลือบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในการตรวจจับ HCV core Ag ผลการตรวจอ่านจากค่าความเข้มข้นของ HCV core Ag ในตัวอย่างซีรัม/พลาสมาโดยใช้กราฟการสอบเทียบของ Architect HCV Ag ถ้าความเข้มข้นของ HCV core Ag ในตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ 3.00 femto mole/liter (fmol/L) หรือ 0.06 pg/mL แสดงว่าให้ผลบวก (positive) และถ้าความเข้มข้นของ HCV core Ag ในตัวอย่างน้อยกว่า 3.00 fmol/L แสดงว่าให้ผลลบ (negative)

2.4 การตรวจ HCV RNA ในตัวอย่างผู้ป่วย

HCV RNA ในตัวอย่างของผู้ป่วยถูกตรวจเชิงปริมาณด้วยเครื่องอัตโนมัติ Cobas Ampli Prep/COBAS Taqman HCV Quantitative Test, v2.0 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) หลักการ real-time RT-PCR โดยการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก (nucleic acid amplification) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) เตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปสกัด HCV RNA (2) เปลี่ยน HCV RNA เป้าหมายให้เป็น cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription และ (3) ขยายสัญญาณการเพิ่มจำนวนของ cDNA เป้าหมาย และตรวจจับ oligonucleotide ที่ติดฉลากคู่ที่จำเพาะต่อ cDNA เป้าหมาย ผลการตรวจวิเคราะห์อ่านค่าเป็นความเข้มข้นในหน่วย international units/milliliter (IU/mL) การตรวจ HCV RNA มีความไวในการตรวจที่ 15 IU/mL หากผลที่ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 15 IU/mL แสดงถึงมีเชื้อในกระแสเลือด (positive) และหากผลที่ได้มีค่าน้อยกว่า 15 IU/mL แสดงว่ามีปริมาณเชื้อต่ำมากในกระแสเลือดจนตรวจไม่พบ หรือไม่ได้มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (negative)

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลผลการวิจัยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value, PPV) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value, NPV) การหาค่า S/CO ratio ใช้การวิเคราะห์จากกราฟ receiver-operating characteristic (ROC) เพื่อหาค่า S/CO ratio ที่ถูกต้องและเหมาะสมเป็นจุดตัด (cutoff point) และหาความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจ HCV core Ag และ HCV RNA วิเคราะห์ด้วย Cohen's kappa coefficient โดยกำหนดให้ค่า $p < 0.001$

3. ผลการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นซีรัม/พลาสมาที่เหลือจากการตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบซี (anti-HCV) ของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวน 169 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากผู้ป่วยที่มีอายุ 19-90 ปี และมีอายุเฉลี่ย 54.1 ± 15.64 ปี แบ่งเป็นเพศชาย 107 ตัวอย่าง (63.3 %) และเพศหญิง 62 ตัวอย่าง (36.7 %) การตรวจ HCV RNA ใน 169 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวก 79 ตัวอย่าง (46.8 %) และผลลบ 90 ตัวอย่าง (53.2 %)

3.1 การหาค่า S/CO ratio ที่ถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการตรวจ Anti-HCV

ผลการวิเคราะห์ ROC curve ของการตรวจ anti-HCV เปรียบเทียบกับผลการตรวจ HCV RNA (รูปที่ 1) พบว่าจุดตัดของ S/CO ratio เพื่อรายงานผลบวก คือ 5.4 ที่ความไว (sensitivity) 100 % (95 % CI, 95.4-100) ซึ่งคำนวณจากค่า number of true positive (79)/[number of true positive (79) + number of false negative (0)] และ

ความจำเพาะ (specificity) 93.3 % (95 % CI, 86.1-97.5) ซึ่งคำนวณจากค่า number of true negative (84)/[number of true negative (84) + number of false positive (6)]

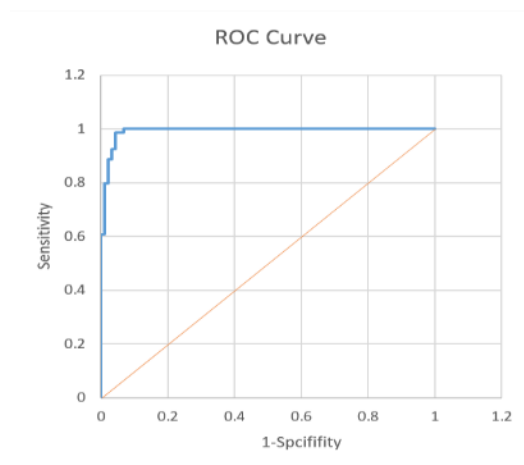


Figure 1 Receiver-operating characteristic (ROC) curve of anti-HCV test

เมื่อวิเคราะห์ค่าความไว (sensitivity) ร่วมกับค่าทำนายผลบวก (positive predictive value, PPV) ที่ 95 % CI ณ จุดตัดที่ > 1 S/CO ratio จนถึง > 7 S/CO ratio ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจ anti-HCV ตรงจุดตัดนั้น พบว่า ณ จุดตัดที่ > 5.4 S/CO ratio ของการตรวจ anti-HCV ให้ค่าความไวและค่าทำนายผลบวกที่สอดคล้องกับการตรวจ HCV RNA มากที่สุด โดยมีค่าความไวและค่าทำนายผลบวกที่ 100 % (95 % CI, 95.4-100) และ 92.9 % (95 % CI, 85.9-96.6) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งจุดตัด > 5.4 S/CO ratio นี้เป็นค่าจุดตัดเดียวกับที่วิเคราะห์ด้วย ROC curve

3.2 การประเมินผลการตรวจ HCV Core Antigen

การตรวจ HCV core Ag ใน 169 ตัวอย่าง ให้ผลตรวจเป็นบวก 78 ตัวอย่าง (46.2 %) และลบ 91

ตัวอย่าง (53.8 %) และเมื่อนำผลตรวจ HCV core Ag ทั้ง 169 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ร่วมกับผลตรวจ HCV RNA พบว่าให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี 78 ตัวอย่าง ให้ผล HCV core Ag เป็นลบ แต่ HCV RNA เป็นบวก 1 ตัวอย่าง และให้ผลลบทั้ง 2 วิธี 90 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจ HCV core Ag กับการตรวจ HCV RNA ที่เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) พบว่าการตรวจ HCV core Ag มีความไว

(sensitivity) 98.7 % ความจำเพาะ (specificity) 100 % ค่าทำนายผลบวก (PPV) 100 % และค่าทำนายผลลบ (NPV) 98.9 % นอกจากนี้เมื่อนำผลการตรวจไปวิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างทั้ง 2 วิธี ดังกล่าว โดยใช้สถิติ Cohen's kappa coefficient พบว่าได้ค่าความสอดคล้อง 0.988 แสดงว่ามีความสอดคล้องของผลการตรวจทั้งสองวิธีที่ระดับดีมากอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$)

Table 1 Results of HCV RNA related to the different cutoff points by the S/CO ratios of CMIA

S/CO ratio (N)	HCV RNA results		Sensitivity (95 % CI)	PPV (95 % CI)
	Positive (%)	Negative (%)		
> 1 (125)	79 (63.2)	46 (36.8)	100 (95.4-100)	63.2 (58.4-67.8)
> 2 (102)	79 (77.5)	23 (22.5)	100 (95.4-100)	77.5 (70.7-83.0)
> 3 (95)	79 (83.2)	16 (16.8)	100 (95.4-100)	83.2 (76.0-88.5)
> 4 (90)	79 (87.8)	11 (12.2)	100 (95.4-100)	87.8 (80.5-95.6)
> 5 (86)	79 (91.9)	7 (8.1)	100 (95.4-100)	91.9 (84.7-95.8)
> 5.4 (85)	79 (92.9)	6 (7.1)	100 (95.4-100)	92.9 (85.9-96.6)
> 6 (84)	78 (92.9)	6 (7.1)	98.7 (93.2-100)	92.9 (85.7-96.6)
> 7 (83)	78 (94.0)	5 (6.0)	98.7 (93.2-100)	94.0 (86.9-97.3)

Table 2 Comparison of HCV core antigen and HCV RNA results

Variables	No. of sample (%)	HCV RNA	
		Positive	Negative
HCV core Ag reactive	78 (46.2 %)	78	0
HCV core Ag non reactive	91 (53.8 %)	1	90
Total	169 (100 %)	79	90

4. วิจัยณ์

การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (anti-HCV) นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส

ตับอักเสบบีในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลต่าง ๆ ทั่วโลก อย่างไรก็ตาม การศึกษาความถูกต้องของผลการตรวจ anti-HCV จาก NHANES 2007-2012

พบผลบวกปลอมถึง 22 % [5] เนื่องจากการตรวจ anti-HCV มีความไวและความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ anti-HCV ในเลือดของผู้ป่วยคงอยู่ได้นานถึง 45-68 วัน [11] ดังนั้นจึงตรวจพบ anti-HCV ได้ทั้งในผู้ป่วยที่กำลังติดเชื้อและผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อมาก่อนหลังจากรักษาหายแล้ว ทำให้ไม่สามารถจำแนกผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มนี้ออกจากกัน และมีโอกาสที่จะตรวจพบผลบวกปลอมได้จากเกมมาโกลบูลินในกระแสเลือดหรือจากโรคออโตอิมมูน (autoimmune disease) โรคตับ หรือโรคติดเชื้อไวรัสอื่น ๆ จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจยืนยันการติดเชื้อโดยวิธีอื่น ๆ เช่น การตรวจ HCV RNA หรือการตรวจ HCV core Ag [12]

การตรวจ HCV RNA นั้นเป็นการตรวจทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative) และปริมาณ (quantitative) ของสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบซี ประกอบด้วยหลายวิธี เช่น reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), transmission-mediated amplification (TMA) และวิธีเรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์ (real time RT-PCR) วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจ anti-HCV และการตรวจ HCV core Ag ในเรื่องของค่าใช้จ่ายที่มีราคาแพง เครื่องมือที่ใช้มีราคาสูง ผู้ตรวจต้องเชี่ยวชาญในการตรวจ และใช้เวลาตรวจนาน รวมทั้งยังมีความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของสารที่จะมารบกวนปฏิกิริยา ซึ่งการตรวจ HCV RNA ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นการตรวจโดยวิธีเรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์เพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและติดตามผลการรักษา การตรวจนี้เป็นการตรวจเชิงปริมาณ โดยรายงานผลเป็นปริมาณไวรัสในหน่วย IU/mL ซึ่ง The European Association for the Study of Liver (EASL) กำหนดค่าที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 15 IU/mL เป็นค่าที่ให้ผลเป็นลบ อย่างไรก็ตาม อาจกำหนดให้ค่าในการรายงานผลเป็นลบที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1,000 IU/mL ได้ในกรณีที่รายได้รวมของ

ประเทศต่ำหรือปานกลาง [13] สำหรับการตรวจ anti-HCV ในผู้ป่วยบางรายที่ให้ผล anti-HCV ต่ำ ๆ เมื่อส่งตรวจ HCV RNA เพื่อยืนยัน อาจให้ผลบวกหรือลบได้ ดังนั้นการกำหนดค่า S/CO ratio ให้เป็นจุดตัด (cutoff point) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ anti-HCV จึงช่วยให้การรายงานผลมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในการส่งตรวจ HCV RNA หรือการส่งตรวจอื่น ๆ ที่ไม่จำเป็น

การศึกษานี้เมื่อนำผลการตรวจ anti-HCV ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ Architect รุ่น Plus i2000sr มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลการตรวจ HCV RNA โดยวิธีเรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์ด้วยกราฟ receiver-operating characteristic (ROC) ได้ค่า S/CO ratio เป็นจุดตัดสำหรับการตรวจ anti-HCV เท่ากับ 5.4 ที่ความไวและความจำเพาะ 100 % (95 % CI, 95.4-100) และ 93.3 % (95 % CI, 86.1-97.5) ตามลำดับ ทั้งนี้ได้มีการศึกษาเพื่อหาค่า S/CO ratio เป็นจุดตัดสำหรับการตรวจ anti-HCV เพื่อให้การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น และลดค่าใช้จ่ายจากการตรวจยืนยันการติดเชื้อโดยวิธีอื่น ๆ เช่น การศึกษาของ Kim ได้ค่า S/CO ratio เป็นจุดตัดสำหรับการตรวจ anti-HCV ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Architect รุ่น i2000 ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 3 ด้วยร้อยละของผลบวก (positivity) 94.9 % [14] การศึกษาของ Seo และคณะ พบว่าค่า S/CO ratio ของการตรวจ anti-HCV ที่สามารถทำนายการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในกระแสเลือด คือ 10.9 ที่ความไว 94.4 % และความจำเพาะ 97.3 % [15] และการศึกษาของ Moretti และคณะ ที่พบว่าค่า 10.3 S/CO ratio เป็นจุดตัดที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ anti-HCV ที่ 95 % PPV โดยไม่ต้องมีการตรวจเพิ่มเติม [16] อย่างไรก็ตาม ผลการตรวจ anti-HCV ด้วยหลักการ CMIA จากการศึกษาพบความจำเพาะ 93.3 % แสดงว่าเมื่อใช้

S/CO ratio ที่ 5.4 เป็นจุดตัดในการตรวจ anti-HCV จึงอาจพบผลลบปลอมได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lopez-Fabal และคณะ ที่พบว่า การตรวจ anti-HCV ด้วยหลักการ chemiluminescence ไม่มีความจำเพาะพอเมื่อใช้ตรวจวินิจฉัยไวรัสตับอักเสบซีแต่เพียงวิธีเดียว จึงควรมีการตรวจยืนยันเพิ่มเติมโดยวิธีอื่นที่มีความจำเพาะสูงกว่า [17]

ข้อจำกัดของการตรวจ HCV RNA ในกรณีที่ตรวจในผู้ป่วยที่ไม่มีเชื้ออยู่ในกระแสเลือด (non viremia patient) อาจให้ผลเป็นลบได้ ขณะที่การตรวจ anti-HCV ให้ผลเป็นบวก [11] ดังนั้นการตรวจ HCV RNA ในห้องปฏิบัติการบางแห่งโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนาจึงไม่นิยมใช้ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี แต่จะนิยมใช้การตรวจ HCV core Ag แทน เนื่องจากตรวจได้ง่าย เชื่อถือได้ มีความไวและความจำเพาะสูง ราคาถูกกว่าการตรวจ HCV RNA สามารถลดระยะเวลาของการติดเชื้อในระยะ window period ลง และมีความเสี่ยงจากสารที่จะมารบกวนปฏิกิริยาน้อยกว่าการตรวจ HCV RNA [18] นอกจากนี้ยังพบว่า HCV core Ag เป็นแคปซิดที่อยู๋ภายในเซลล์ของไวรัสตับอักเสบซีและเป็นแหล่งกักเก็บแอนติเจนจำนวนมาก ซึ่งในระหว่างที่มีการประกอบกันเป็นอนุภาคของไวรัส แอนติเจนชนิด nucleocapsid peptide 22 (p22) จะถูกปล่อยออกมาในเลือด ทำให้ตรวจพบได้เร็วกว่าการตรวจแอนติบอดี และยังตรวจได้ตลอดระยะเวลาของการติดเชื้อ [19,20] การตรวจ HCV core Ag นิยมใช้ตรวจเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีมากขึ้นถึงแม้ว่าจะมีความไวต่ำกว่าการตรวจ HCV RNA แต่พบว่ามากกว่า 50 % ของการตรวจ anti-HCV ที่ให้ผลบวก จะให้ผลตรวจ HCV core Ag เป็นบวก จึงนำมาใช้ตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในกรณีที่ผลตรวจ anti-HCV เป็นบวก อีกทั้งยังตรวจได้ง่ายและรายงาน

ผลตรวจได้อย่างรวดเร็ว [21]

การศึกษานี้ได้มีการตรวจ HCV core Ag ในตัวอย่างเปรียบเทียบผลกับการตรวจ HCV RNA ที่เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) พบว่ามีความไว 98.7 % ความจำเพาะ 100 % ค่าทำนายผลบวก 100 % และค่าทำนายผลลบ 98.9 % นอกจากนี้เมื่อนำผลการตรวจไปวิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจ HCV core Ag และ HCV RNA โดยใช้สถิติ Cohen's kappa coefficient พบว่าได้ค่าความสอดคล้อง 0.988 แสดงว่ามีความสอดคล้องของผลการตรวจทั้งสองวิธีที่ระดับดีมากอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ซึ่งค่าความไวที่ได้ 98.7 % การวิจัยนี้พบว่าให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ Kesli และคณะ [11] และ Song และคณะ [22] ที่พบค่าความไวในการตรวจ HCV core Ag เท่ากับ 96.3 และ 97.2 % ตามลำดับ ส่วนค่าความจำเพาะ 100 % ที่ได้จากการวิจัยนี้มีค่าเหมือนกับผลการศึกษาของ Kesli และคณะ [11] Park และคณะ [23] และ Ross และคณะ [24]

การศึกษานี้ได้ค่าความจำเพาะและค่าทำนายผลบวก 100 % แสดงให้เห็นว่าการตรวจ HCV core Ag ไม่พบผลลบปลอม นั่นคือ ตัวอย่างของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกโดยการตรวจ HCV core Ag ทั้งหมดให้ผลบวกกับวิธี HCV RNA ที่เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ดังนั้นการตรวจ HCV core Ag อาจนำมาใช้ตรวจยืนยันในกรณีที่ผลตรวจ anti-HCV ให้ค่า S/CO ratio น้อยกว่า 5.4 เพื่อป้องกันการเกิดผลลบปลอมจากการตรวจ anti-HCV เพราะการตรวจ HCV core Ag ให้ค่าความจำเพาะ 100 % อย่างไรก็ตาม การตรวจ HCV core Ag ด้วยน้ำยาของเครื่องอัตโนมัติ Architect ร่วมกับการตรวจ anti-HCV อาจทำให้เกิดผลลบปลอมจากการตรวจ HCV core Ag จึงไม่ควรตรวจทั้ง 2 วิธี ในเครื่องเดียวกัน หากไม่สามารถแยกเครื่องตรวจควรบำรุงรักษาประจำวัน

(daily maintenance) ก่อนและหลังการตรวจ HCV core Ag

การศึกษาครั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างที่มีการจำแนกจีโนไทป์ (genotype) ของไวรัสตับอักเสบซี และในตัวอย่างที่มีการตรวจเอนไซม์ในตับ เช่น เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ผลการศึกษาในครั้งนี้ควรมีการนำไปใช้ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากอาจมีข้อจำกัดในเรื่องน้ำยาตรวจที่มีเวอร์ชันต่างกัน กลุ่มประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา รวมทั้งผลการรักษาด้วยยาต้านไวรัส ลักษณะอาการทางคลินิก ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การติดเชื้อร่วมกับไวรัสอื่น ๆ เช่น ไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งอาจมีผลต่อการศึกษาวิจัย

5. สรุป

การตรวจการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยการตรวจ anti-HCV ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Architect plus i2000sr ที่ค่าจุดตัด 5.4 S/CO ratio มีความไว 100 % (95 % CI, 95.4-100) ความจำเพาะ 93.3 % (95 % CI, 86.1-97.5) และค่าทำนายผลบวก (PPV) 92.9 % (95 % CI, 85.9-96.6) ผลการตรวจวิเคราะห์ HCV core antigen มีความไว 98.7 % ความจำเพาะ 100 % ค่าทำนายผลบวก (PPV) 100 % และค่าทำนายผลลบ (NPV) 98.9 % และมีความสอดคล้องกับการตรวจ HCV RNA ในระดับดีมากอย่างมีนัยสำคัญ ($Kappa = 0.988, p < 0.001$)

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ หัวหน้าห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ หน่วยเวชระเบียน ที่อนุญาตให้มีการเก็บข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ขอคุณ ผศ.ดร.ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์ คุณอนุรักษ์ เชื้อมั่ง คุณสุวิทย์ รื่นสุข

ผู้ร่วมงาน ครอบครัว และมิตรสหาย สำหรับคำแนะนำต่าง ๆ และขอบคุณความเมตตาอัลลอฮ์ ขอบพระคุณพระคณาจารย์ที่ให้การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย

7. References

- [1] World Health Organization, Hepatitis C, Available Source: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>, March 15, 2021.
- [2] Sy, T. and Jamal, M.M., 2006, Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection, *Int. J. Med. Sci.* 3: 41-46.
- [3] Petruzzello, A., Marigliano, S., Loquercio, G., Cozzolino, A. and Cacciapuoti, C., 2016, Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes, *World J. Gastroenterol.* 22: 7824-7840.
- [4] Jiamsiri, S., 2018, Hepatitis C Virus Disease, Available Source: <https://apps.doe.moph.go.th/boe/viewddcw.php>, December 22, 2018. (in Thai)
- [5] Moorman, A.C., Drobeniuc, J. and Kamili, S., 2017, Prevalence of false-positive hepatitis C antibody results, *National Health and Nutrition Examination Study (NHANES) 2007-2012*, *J. Clin. Virol.* 89: 1-4.
- [6] Pereira, F.M., Zarife, M.A., Reis, E. and Reis, M.G., 2014, Indeterminate RIBA results were associated with the absence of hepatitis C virus RNA (HCV-RNA) in blood

- donors, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47: 12-17.
- [7] Bossi, V. and Galli, C., 2004, Quantitative signal of anti-HCV by an automated assay predicts viremia in a population at high prevalence of hepatitis C virus infection, *J. Clin. Virol.* 30: 45-49.
- [8] Majid, A.M. and Gretch, D.R., 2002, Current and future hepatitis C virus diagnostic testing: problems and advancements, *Microbes Infect.* 4: 1227-1236.
- [9] Committee, T., 2018, Thailand practice guideline for management of chronic hepatitis C 2018, *Thai J. Hepatol.* 1(3): 50-60. (in Thai)
- [10] Laboratories A, Architect system Anti-HCV October 2009, Available Source: https://www.ilexmedical.com/files/PDF/AntiHCV_ARC.pdf, March 15, 2021.
- [11] Kesli, R., Polat, H., Terzi, Y., Kurtoglu, M. and Uyar, Y., 2011, Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C virus (HCV) core antigen test with the HCV RNA assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results, *J. Clin. Microbiol.* 49: 4089-4093.
- [12] Couroucé, A., Marrec, N., Bouchardeau, F., Razer, A., Maniez, M., Laperche, S. and Simon, N., 2000, Efficacy of HCV core antigen detection during the presser conversion period transfusion, *Transfusion* 40: 1198-1202.
- [13] European Association for the Study of the Liver, EASL Recommendations on treatment of hepatitis C 2018, 2018, *J. Hepatol.* 69: 461-511.
- [14] Kim, H.S., 2009, Anti-HCV signal-to-cutoff ratio in predicting hepatitis C viremia, *Korean J. Int. Med.* 24: 299-301.
- [15] Seo, Y.S., Jung, E.S., Kim, J.H., Jung, Y.K., Kim, J.H., An, H., Yim, H.J., Yeon, J.E., Byun, K.S., Kim, C.D., Ryu, S.H. and Um, S.H., 2009, Significance of anti-HCV signal-to-cutoff ratio in predicting hepatitis C viremia, *Korean J. Int. Med.* 24: 302-308.
- [16] Moretti, M., Pieretti, B., Masucci, A., Sisti, D., Rocchi, M. and Delprete, E., 2012, Role of signal-to-cutoff ratios in hepatitis C virus antibody detection, *Clin. Vaccine Immunol.* 19: 1329-1331.
- [17] López-Fabal, M., Pérez-Rivilla, A. and Gómez-Garcés, J.L., 2018, Evaluation of sera with a low signal to cut-off ratio using two chemiluminescent assays for detecting Hepatitis C Virus, and their correlation with the detection of viral RNA, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 36: 222-224.
- [18] Yokosuka, O., Kawai, S., Suzuki, Y., Fukai, K., Imazeki, F., Kanda, T., Saisho, H., 2005, Evaluation of clinical usefulness of second-generation HCV core antigen assay: comparison with COBAS AMPLICOR HCV MONITOR assay version 2.0, *Liver Int.* 25: 1136-1141.
- [19] Tanaka, E., Kiyosawa, K., Matsumoto, A.,

- Kashiwakuma, T., Hasegawa, A., Mori, H., Yanagihara, O. and Ohta, Y., 1996, Serum levels of hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alfa, *Hepatology* 23: 1330-1333.
- [20] Tedder, R.S., Tuke, P., Wallis, N., Wright, M., Nicholson, L. and Grant, P.R., 2013, Therapy-induced clearance of HCV core antigen from plasma predicts an end of treatment viral response, *J. Viral. Hepat.* 20: 65-71.
- [21] Tillmann, H.L., 2014, Hepatitis C virus core antigen testing: Role in diagnosis, disease monitoring and treatment, *World J. Gastroenterol.* 20: 6701-6706.
- [22] Song, D., Kang, J.E., Kim, S.Y., Hwang, S.H., Kim, H.H., Lee, E.Y. and Son, H.C., 2010, Evaluation of ARCHITECT HCV core antigen assay, *Korean J. Lab. Med.* 30: 654-659.
- [23] Park, Y., Lee, J.H., Kim, B.S., Kim, D.Y., Han, K.H. and Kim, H.S., 2010, New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification, *J. Clin. Microbiol.* 48: 2253-2256.
- [24] Ross, R.S., Viazov, S., Salloum, S., Hilgard, P., Gerken, G. and Roggendorf, M., 2010, Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification, *J. Clin. Microbiol.* 48: 1161-1168.