

**นิพนธ์ต้นฉบับ**

## การเตรียม Internal Control สำหรับการตรวจหา Anti-HIV Antibody\*

ศาสตราจารย์พรประเสริฐ\*\* กิตติพงศ์ รุ่งเรืองธนกิจ\*\*\* ดวงนภา กิ่งแก้ว\*\*\* นายสุรีย์ ศุภวิไล\*\*\*

### บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ เอชไอวี จะให้ผลที่ถูกต้องเป็นที่น่าเชื่อถือได้นั้นทางห้องปฏิบัติการต้องมีการควบคุมคุณภาพและการประกันคุณภาพที่ดี ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงได้ทำการเตรียม Internal control ขึ้นมาเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพการตรวจหา Anti-HIV antibody โดยนำซีรัมผู้ติดเชื้อ เอชไอวี ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบหา Anti-HIV antibody มาเจือจางด้วยซีรัมคนปกติ จนกระทั่งให้ค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) ของปฏิกิริยาเมื่อทดสอบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Vironostika® HIV Uni-Form II plus O ของบริษัท Organon Teknika มีค่าประมาณ 0.5 จากนั้นแบ่งซีรัมที่เจือจางแล้วเป็นส่วนละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 °ซ และทุกครั้งที่ทดสอบซีรัมตัวอย่าง จะนำเอาหนึ่งส่วนมาทดสอบควบคู่ไปด้วย เพื่อเป็น Internal control เพิ่มเติมจาก Control ที่ทางบริษัทให้มาพร้อมกับชุดน้ำยาตรวจ พบว่าจะต้องทำการเจือจางซีรัมผู้ติดเชื้อ เอชไอวี ด้วยซีรัมคนปกติจนมีค่าเป็น 1:5,000 จึงจะให้ค่า OD ประมาณ 0.5 ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็น Internal control และตลอดระยะเวลาประมาณ 9 เดือน ที่ได้ทำการทดสอบ Internal control ควบคู่กับซีรัมตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนทั้งหมด 37 ครั้งพบว่า OD ของ Internal control serum อยู่ในช่วง 0.477 ถึง 0.832 คิดเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) เท่ากับ 0.625 โดยค่า OD ของ Internal control ที่ได้จากการทดสอบในแต่ละครั้งจะอยู่ในช่วง  $\text{mean} \pm 2\text{SD}$  (0.451–0.798) ยกเว้นเพียงหนึ่งครั้งเท่านั้น ทำให้เชื่อมั่นได้ว่าการทดสอบในแต่ละครั้งมีความแม่นยำ (Precision) และค่า OD ที่วัดได้จากซีรัมตัวอย่างมีความถูกต้อง (Accuracy) เป็นผลให้เกิดความมั่นใจในการแปลผลเมื่อเทียบกับค่า Eusa cut off โดยเฉพาะในกรณีที่ซีรัมตัวอย่างให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่า Cut off ไม่มาก ดังนั้นจึงสามารถใช้ซีรัมผู้ติดเชื้อ เอชไอวี ที่เจือจางด้วยซีรัมคนปกติจนมีค่า OD ประมาณ 0.5 มาเป็น Internal control สำหรับการตรวจหา Anti-HIV antibody ได้. วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ 2542; 32: 20-4.

**คำรหัส :** การควบคุมคุณภาพ, แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี

\* งานวิจัยได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากทุนวิจัยเลขที่ R21 AI 33862 จาก National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, USA.

\*\* ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\*\*\* ฝ่ายวิจัยจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**Abstract : Preparation of Internal Control for Anti-HIV Antibody Detection\***

Pornprasert S\*\*, Rungruengthanakit K\*\*\*, Kingkaew D\*\*\*, Suphavilai C\*\*\*

An accurate and acceptable HIV infection testing were based on quality control and quality assurance of the laboratory. In this study, we had set an internal control as a quality control for detection of anti-HIV antibody by diluting pooled HIV positive serum with pooled normal serum. Diluted serum was tested with Vironostika HIV Uni-Form II Plus O (Organon Teknika) to obtain the OD reading at about 0.5. Diluted serum was then aliquoted into 100  $\mu$ L and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . One aliquot of the diluted serum was used as an internal control together with controls provided by the anti-HIV antibody ELISA kit. It was found that the dilution of a current batch of internal control which gave OD reading at approximately 0.5 was 1:5000. During 9 months of this study, the internal control serum has been tested for 37 times. The OD range from 0.477 to 0.832 with a mean OD of 0.625 was obtained. All but one OD reading were within the range of mean  $\pm$  2SD (0.451-0.798) indicated the precise assay and accurate OD reading value, particularly, in the serum samples which gave the OD reading only just above the ELISA cut-off value. Therefore, the 1:5,000 diluted HIV positive serum could be used as an internal control for anti-HIV antibody detection. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 1999; 32: 20-4.

**Key words :** Internal control, anti-HIV antibody

\* Support in part by a grant (R21 AI 33862) from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, USA.

\*\* Department of Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University,

\*\*\* Microbiology and Immunology Division, Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University,

**บทนำ**

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีความถูกต้อง (Accuracy) แม่นยำ (Precision) จึงสนับสนุนการวินิจฉัยโรค การรักษาพยาบาล ตลอดจนการเฝ้าระวังโรค ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

และการที่จะได้มาซึ่งความถูกต้องแม่นยำนั้น ทางห้องปฏิบัติการต้องมีระบบประกันคุณภาพ (Quality assurance) และระบบควบคุมคุณภาพ (Quality control) ที่ดี สำหรับการประกันคุณภาพ และควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตรวจ

วินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี ถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เพราะโรคเอดส์ถือว่าเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาที่ร้ายแรงอย่างมากสำหรับสังคมปัจจุบัน<sup>2</sup> การทดสอบซีรัมตัวอย่างเพื่อตรวจหา Anti-HIV antibody เพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปในแต่ละครั้งถึงแม้จะทำการทดสอบ Negative และ Positive serum ของบริษัทผู้ผลิตชุดน้ำยาควบคุมไปด้วยทุกครั้งก็ตาม ปัญหาที่มักพบคือ Positive control serum ของบริษัทจะให้ค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) ที่ค่อนข้างสูง ทำให้เกิดความไม่มั่นใจในการแปลผลซีรัมตัวอย่างในรายที่ให้ค่า OD สูงเกินค่า ELISA cut off (ประมาณ 0.2) เพียงเล็กน้อย ดังนั้นการศึกษานี้ได้นำซีรัมของผู้ติดเชื้อเอชไอวี มาเจือจางด้วยซีรัมคนปกติจนให้ค่า OD ประมาณ 0.5 เพื่อใช้เป็น Internal control สำหรับการตรวจหา Anti-HIV antibody ในห้องปฏิบัติการ

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การหาค่าเจือจาง (Dilution) ที่เหมาะสมของ Internal control

นำซีรัมผู้ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 3 ราย รายละ 0.5 มล. มาผสมรวมกัน ซีรัมผู้ติดเชื้อแต่ละรายให้ผลบวกกับการทดสอบด้วยวิธี ELISA ของสองบริษัทคือ Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus (Behringwerke AG, Germany) และ Abbott Labs (N. Chicago, USA) นอกจากนี้ยังให้ผลบวกกับ Western blot (HIV Blot 2.2, Genelabs, Singapore) แบ่งซีรัมผสมของผู้ติดเชื้อมาเจือจางด้วยซีรัมคนปกติในอัตราส่วน 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1,000, 1:5,000, 1:10,000, 1:20,000, 1:40,000, 1:80,000, 1:160,000, และ 1:320,000 จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี ELISA (Vironostika® HIV Uni-Form II

Plus O, Organon Teknika, The Netherlands) แล้วเลือก Dilution ที่ให้ค่า OD ประมาณ 0.5 มาใช้เจือจางซีรัมผู้ติดเชื้อในส่วนที่เหลือ เพื่อใช้เป็น Internal control

### 2. เตรียม Internal control จากซีรัมผู้ติดเชื้อเอชไอวี

นำซีรัมผสมของผู้ติดเชื้อเอชไอวี มาเจือจางด้วยซีรัมคนปกติในอัตราส่วนที่เลือกได้จากการทดลองข้อ 1 จากนั้นแบ่งเป็น ส่วนๆ ละ 100  $\mu$ L แล้วเก็บไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  แต่ละส่วนจะนำมาใช้เป็น Internal control สำหรับทดสอบพร้อมกับซีรัมตัวอย่าง โดยแต่ละส่วนจะถูกแช่แข็งและละลายเพื่อใช้งานเพียงครั้งเดียว

### 3. การทดสอบ Internal control ควบคู่ไปกับซีรัมตัวอย่าง

ทุกครั้งที่ทดสอบซีรัมตัวอย่างด้วยวิธี ELISA จะนำเอา 1 ส่วนของ Internal control ที่เตรียมไว้มาทดสอบควบคู่ไปด้วย นอกเหนือไปจาก Positive และ Negative control ของบริษัทที่ให้มาพร้อมชุดน้ำยาตรวจและค่า OD ของ Internal control serum ที่วัดได้จากการทดสอบในแต่ละครั้งจะถูกบันทึกไว้แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่อไป

## ผลการทดลอง

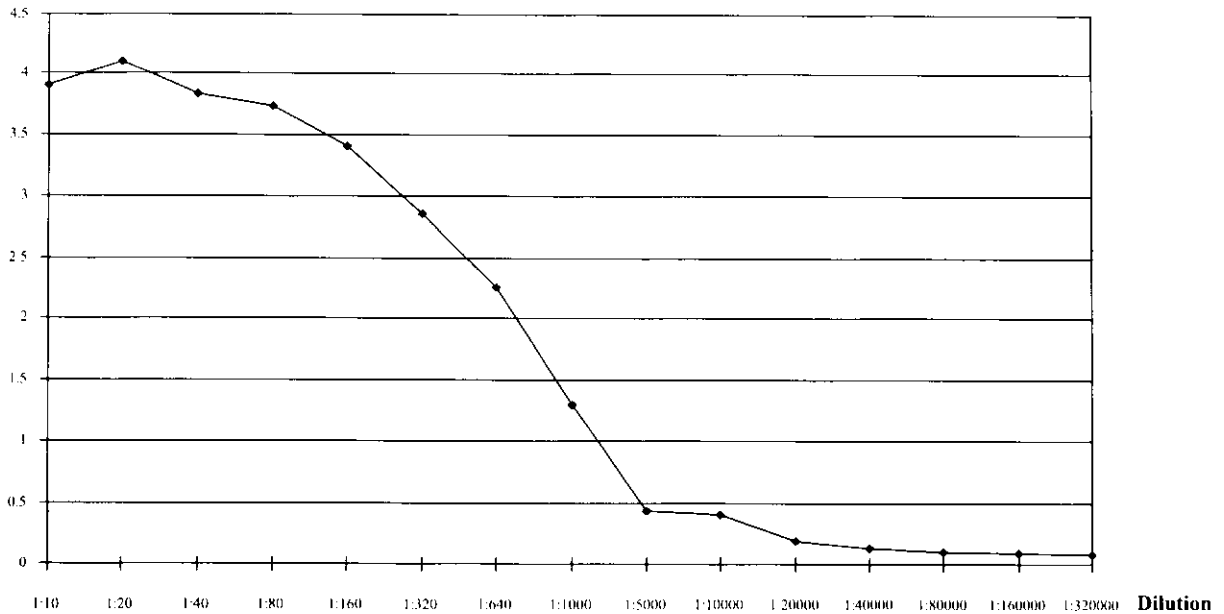
### การเตรียม Internal control

โดยทั่วไปการตรวจหา Anti-HIV antibody ในซีรัมผู้ติดเชื้อ เอชไอวี ด้วยวิธี ELISA มักให้ค่าปฏิกิริยาการดูดกลืนแสง (OD) ที่สูงมาก ดังนั้นการที่จะเตรียม Internal control เพื่อให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.5 จึงต้องมีการนำซีรัมผู้ติดเชื้อ เอชไอวี มาเจือจางด้วยซีรัมคนปกติก่อน จากการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างซีรัมผู้ติดเชื้อ เอชไอวี กับซีรัมคนปกติ พบว่าต้องนำซีรัมผู้ติดเชื้อ

เอชไอวีมาเจือจางด้วยซีรัมคนปกติในอัตราส่วน

1:5000 (รูปที่ 1) จึงจะได้ค่า OD ประมาณ 0.5

OD.



รูปที่ 1 อัตราการเจือจางที่เหมาะสมของ Internal control: Dilution ที่ให้ค่า OD ประมาณ 0.5 จะนำไปใช้เตรียม Internal control

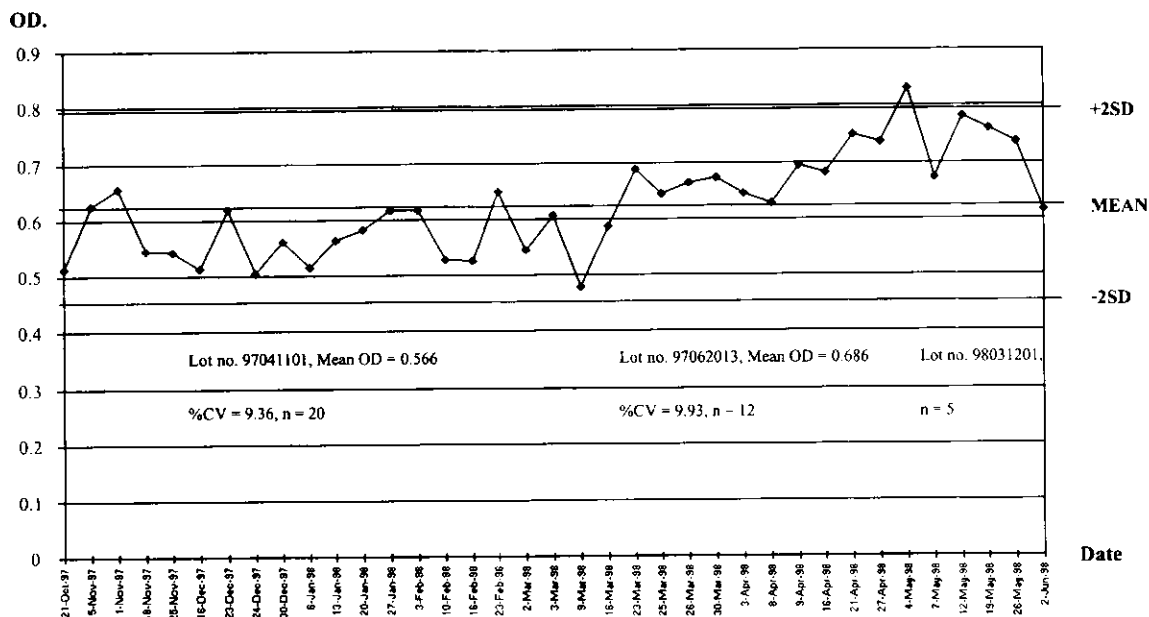
### การทดสอบ Internal control ควบคู่ไปกับซีรัมตัวอย่าง

จากการศึกษาตลอดระยะเวลา 9 เดือน ได้ใช้ Internal control ที่เตรียมขึ้นมาทดสอบควบคู่ไปกับ ซีรัมตัวอย่าง เพื่อตรวจหา Anti-HIV antibody ด้วยชุดตรวจ Vironostika HIV Uni-Form II Plus O พบว่าในการทดสอบทั้งหมดจำนวน 37 ครั้ง ค่า OD ของ Internal control อยู่ในช่วง 0.477 ถึง 0.832 โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) เท่ากับ 0.625 เมื่อคำนวณค่า  $\text{Mean} \pm 2\text{SD}$  จะมีค่าเท่ากับ 0.798 และ 0.451 ซึ่งจะเห็นว่าค่า OD ของ Internal control ในการทดสอบทั้งหมด 37 ครั้ง มีเพียงครั้งเดียวเท่านั้นที่ให้ค่าเกิน  $\text{Mean} \pm 2\text{SD}$  (รูปที่ 2)

### วิจารณ์ผล

จุดมุ่งหมายในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ

เอชไอวี คือการนำผลการตรวจที่ได้ไปใช้ประโยชน์อย่างสูงสุดต่อทั้งผู้รับการตรวจและต่อบุคคลอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับผู้รับการตรวจ<sup>3</sup> ดังนั้นเพื่อให้ผลการตรวจในแต่ละครั้งมีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นที่เชื่อถือได้ ทางห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีมาตรการประกันคุณภาพและควบคุมคุณภาพที่ดีและต้องกระทำอย่างต่อเนื่อง<sup>4-5</sup> ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เตรียม Internal control สำหรับการตรวจหา Anti-HIV antibody โดยวิธี ELISA ขึ้นมาใช้เอง โดย Internal control นี้ได้ปรับให้มีค่า OD reading ประมาณ 0.5 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่สูงกว่าระดับค่า Cut off เล็กน้อย เมื่อใช้ Internal control serum ที่มีค่า OD ประมาณ 0.5 ทดสอบควบคู่ไปกับซีรัมตัวอย่าง พบว่า 36 ใน 37 ครั้งของ Internal control ให้ค่า OD อยู่ในช่วง  $\text{Mean} \pm 2\text{SD}$  ทำให้เชื่อมั่นได้ว่าการทดสอบในแต่ละครั้งมีความแม่นยำ



รูปที่ 2 ค่า OD และค่า Mean  $\pm$  2SD ของ Internal control จากการทดสอบ 37 ครั้ง

และค่า OD ที่วัดได้จากซีรัมตัวอย่างมีความถูกต้อง ทำให้มีความมั่นใจในการแปลผลเมื่อเทียบกับ Cut off โดยเฉพาะในกรณีทีซีรัมตัวอย่างให้ค่า OD ที่สูงกว่า Cut off ไม่มากนัก อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าการใช้น้ำยาต่าง Lot กันจะให้ค่า OD ที่แตกต่างกันบ้าง โดยในการทดสอบ Internal control กับน้ำยา Lot ที่สูง (Lot No 97062013) พบว่ามีหนึ่งครั้งที่ได้ค่า OD เกิน mean + 2SD เมื่อคำนวณค่า OD เฉลี่ยของการทดสอบด้วยน้ำยาตรวจในแต่ละ Lot พบว่าค่าเฉลี่ยของ Lot ที่สองจะมากกว่า Lot แรก (Lot No 97041101) คือมีค่าเท่ากับ 0.686 และ 0.566 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation, CV) ของแต่ละ Lot ยังคงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ( $<10\%$ ) คือมีค่าเท่ากับ 9.36% และ 9.93% ใน Lot ที่หนึ่งและสองตามลำดับ

### เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
2. สุรพล เกาะเรียนอุดม. เอดส์: การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. นนทบุรี: ชุมชนการเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2539.
3. Dhingra N, Sharma AK, Madan N. Analysis of quality assurance programmes for HIV screening in blood transfusion centres in Delhi. Bull WHO 1997; 75: 223-8.
4. NIMH Multisite HIV Prevention Trial. Quality control and quality assurance in HIV prevention research: model from a multisite HIV prevention trial. AIDS 1997; 11: 49-53.
5. Kamb ML, Dillon BA, Fishbein M, *et al.* Quality assurance of HIV prevention counselling in a multicenter randomized controlled trial. Public Health Rep 1996; 111 (Suppl 1): 99-107.