

A Comparison of Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) and Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) for Thyroid Stimulating Hormone Receptor Antibodies (TSH Receptor Antibodies)

Soonthorn Buahom, Aphinyaphiwat Suriyo, Mewadee Preecha, Mongkol Kunakorn
and Rakruthai Thongchai*

*Clinical Immunology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi
Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Abstract

Thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) antibodies are one of immunological biomarkers for hyperthyroidism investigation, especially in the evaluation of Graves' disease. The TSHR antibodies remarkably involved the pathogenesis of Graves' disease by the binding of TSHR (TSHR agonists) and resulted in up-regulated thyroid hormone production. Consequently, the TSHR antibodies have been used as a diagnostic tool and follow-up marker in most patients with Graves' disease. However, the heterogeneous assays of TSHR antibody detections in lab-to-lab probably have some effect on the result interpretation. This study aimed to compare the TSHR antibody results from patients with Graves' disease (n = 309) carried out by two different operating assays; including an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) using Cobas E 801 (ATSHR) and chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) using Alinity i (TRAb). The level of TSHR antibody detected by both ATSHR and TRAb were 0.81-39.50 (6.84 ± 7.45) IU/L and 0.82-48.34 (8.18 ± 8.26) IU/L, respectively. As a comparative analysis, this research demonstrated that both assays had approximately 94.5% consistency of results based on cross-tab analysis. Moreover, the results also provided strong correlation between the two assays (Cohen's kappa and Spearmans correlation test were 0.865 and 0.958, respectively). In terms of precision analysis, the within-run precisions from all levels of standard controls showed that the TRAb had lower coefficient of variation (CV) when compared to the ATSHR suggesting that the TRAb probably had slightly higher precision than the ATSHR in this

*Corresponding author E-mail address: rakruthai@hotmail.com

study. In conclusion, this study indicated that the detection of TSHR antibodies can be measured by any of the two assays without giving dissimilarity of results. However, each laboratory should evaluate the assays and study their own reference range prior to clinical use.

Keywords: ATSHR, Graves' disease, Thyroid stimulating hormone receptor antibodies, TRAb

การเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ Thyroid Stimulating Hormone Receptor Antibodies (TSH Receptor Antibodies) ด้วยหลักการ Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) และ Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)

สุนทร บัวหอม อภิญญาภรณ์ สุริโย เมวดี ปรีชา มงคล คุณากร และ รักฤทัย ทองไชย*

ห้องปฏิบัติการหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ค่า thyroid stimulating hormone receptor antibodies (TSHR antibodies) ถือเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่ใช้ในการวินิจฉัยแยกแยะและหาสาเหตุของ hyperthyroidism ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงโรค Graves' disease ได้ ดังนั้นการตรวจหาค่า TSHR antibodies ในสิ่งส่งตรวจจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรคนี้ได้ โดยปัจจุบันมีวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาค่า TSHR antibodies หลากหลายวิธี งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และความสอดคล้องในการตรวจวิเคราะห์ TSHR antibodies ด้วยหลักการ chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) และ electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) โดยการวิเคราะห์ความแม่นยำของแต่ละหลักการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลการทดสอบค่า TSHR antibodies ของเครื่องตรวจวิเคราะห์ ATSHR หลักการ ECLIA และเครื่องตรวจวิเคราะห์ TRAb หลักการ CMIA จากกลุ่มตัวอย่าง 309 ราย ผลการศึกษาพบว่าทั้งสองวิธีมีผลรวมความสอดคล้องอยู่ที่ร้อยละ 94.50 มีค่าความสอดคล้องอยู่ในระดับดีมาก (Cohen's kappa เท่ากับ 0.865) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สเปียร์แมนเท่ากับ 0.958 แสดงถึงความสัมพันธ์ของการทดสอบมีแนวโน้มของความสัมพันธ์ที่ดีและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน จึงสรุปได้ว่าชุดการทดสอบทั้งสองวิธีสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาค่า TSHR antibodies ทดแทนกันได้เนื่องจากมีค่าความสัมพันธ์และความสอดคล้องกันอยู่ในระดับดีมาก และพบว่าทั้งสองชุดการทดสอบมีความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์หาค่า TSHR antibodies ที่ดีและอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ อย่างไรก็ตามทางห้องปฏิบัติการควรมีการศึกษาหาช่วงอ้างอิงของค่า TSHR antibodies ของตนเองตามลักษณะเฉพาะของแต่ละห้องที่และกลุ่มประชากรเพิ่มเติมเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรายงานผลการทดสอบ

คำสำคัญ: ATSHR, Graves' disease, Thyroid stimulating hormone receptor antibodies, TRAb

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: rakruthai@hotmail.com

รับบทความ: 28 กรกฎาคม 2565

แก้ไขบทความ: 14 ธันวาคม 2565

รับตีพิมพ์บทความ: 18 มกราคม 2566

บทนำ

โรค Graves' disease เป็นโรคแพ้ภูมิตนเองรูปแบบหนึ่งของภาวะ hyperthyroidism ซึ่งเกิดได้จากการมีอโตแอนติบอดี (autoantibodies) ต่อ thyroid stimulating hormone (TSH หรือเรียกว่า thyrotropin) receptor (TSHR) ที่อยู่บน thyroid cells^(1,2) TSHR antibodies ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงความไวทางคลินิกและความจำเพาะทางคลินิกต่อโรค Graves' disease เมื่อใช้เป็นตัวช่วยวินิจฉัยแยกและหาสาเหตุของ hyperthyroidism⁽³⁾ โดยสามารถจัดประเภทของแอนติบอดีเหล่านี้เป็นได้ทั้ง stimulating, blocking หรือ neutral ขึ้นอยู่กับกลไกการทำงาน และถึงแม้จะมีการทำงานที่คล้ายกับ TSH แต่ TSHR stimulating antibodies ไม่ถือเป็น negative feedback ทัวไปของระดับไทรอยด์ฮอร์โมนที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีการกระตุ้นต่อมไทรอยด์อย่างต่อเนื่องนำไปสู่อาการไทรอยด์เป็นพิษทั่วไปเนื่องจากภาวะ hyperthyroidism จากโรค Graves' disease^(4, 5) ข้อบ่งชี้สำหรับการพิจารณา TSHR antibodies ได้แก่ การตรวจพบของ autoimmune hyperthyroidism และจะมีความแตกต่างจากการกระจายมาจากต่อมไทรอยด์ โดยการตรวจพบ TSHR antibodies บ่งชี้ว่าภาวะ thyrotoxicosis ของผู้ป่วยมีสาเหตุจาก autoimmune มากกว่าที่จะเกิดจาก toxic nodular goiter^(6, 7) เนื่องจากเป้าหมายของการรักษาโรค Graves' disease อาจแตกต่างจากการรักษา thyrotoxicosis รูปแบบอื่น

ดังนั้น การตรวจหา TSHR antibodies จึงมีความเหมาะสมและชัดเจน ในการใช้เฝ้าติดตามการรักษาของผู้ป่วยโรค Graves' disease และการพยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของโรคเพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการจัดการการรักษา ซึ่งระดับ TSHR antibodies ที่มีแนวโน้มลดลงระหว่างการรักษาด้วยยา antithyroid หรือระดับ TSHR antibodies ที่ต่ำลง

หรือการตรวจไม่พบ หลังการรักษาด้วยยาอาจบ่งชี้ถึงการทุเลาของโรคซึ่งจะสามารถใช้ในการพิจารณาหยุดการรักษาได้⁽⁸⁻¹⁰⁾ การตรวจวัด TSHR antibodies ในช่วงไตรมาสสุดท้ายของการตั้งครรภ์ เนื่องจาก TSHR antibodies เป็นแอนติบอดีชนิด IgG จึงสามารถผ่านเข้าสู่รกและอาจทำให้เกิด neonatal thyroid disease ได้ การวัด TSHR antibodies ระหว่างตั้งครรภ์ในผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคไทรอยด์จึงมีความสำคัญในการประเมินความเสี่ยงของการเป็นโรคไทรอยด์ในทารกแรกเกิด รวมถึงการตรวจวัด TSHR antibodies ยังมีประโยชน์ในกรณีที่แพทย์พบข้อสงสัยของโรค Graves' disease ในผู้ป่วยที่มีค่าการทดสอบการทำงานของต่อมไทรอยด์ปกติที่แสดงอาการ extrathyroidal เช่น endocrine exophthalmos, pretibial myxedema และ thyroid acropachy⁽¹¹⁾ ดังนั้นการตรวจหาค่าของ TSHR antibodies จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยและติดตามการรักษาของโรคนี้ได้

หลักการ electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Roche Diagnosis: Cobas E 801 (ATSHR) เป็นวิธีที่ใช้ human thyroid-stimulating monoclonal antibody M22 ซึ่งเป็นการทดสอบรุ่นที่ 3 (third generation) เพื่อตรวจหา TSHR antibodies^(12, 13) โดยการมี TSHR antibodies ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (ซีรัม) จะเข้าไปยับยั้งการจับกันของ labeled thyroid stimulating hormone กับ TSHR ซึ่งจะใช้ porcine TSHR (pTSHR) immunocomplexed กับ biotinylated mouse monoclonal antibody ต่อ pTSHR C-terminus และ human thyroid-stimulating monoclonal antibody M22 ติดฉลากกับ ruthenium complex ส่วนหลักการ chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Abbott Laboratories:

Alinity i (TRAb) เป็นการทดสอบรุ่นที่ 3 (third generation) เพื่อตรวจหา TSHR antibodies โดยใช้ human thyroid-stimulating monoclonal antibody M22 เช่นเดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันที่ TRAb จะใช้ M22 antibody acridinium-labeled conjugate จะแย่งกันกับ TRAb ใน serum เพื่อจับกับ human TSHR บน microparticle ซึ่งหลักการนี้ จะไม่มี biotin เข้ามารบกวนปฏิกิริยาของการตรวจวิเคราะห์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และความสอดคล้องในการตรวจวิเคราะห์ thyroid stimulating hormone receptor antibodies (TSHR antibodies) ด้วยหลักการ chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) และ electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) โดยการวิเคราะห์ความแม่นยำของแต่ละหลักการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลการทดสอบค่า TSHR antibodies ของ ATSHR และ TRAb เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกและพิจารณาหลักการและเครื่องตรวจวิเคราะห์หา TSHR antibodies แก่ห้องปฏิบัติการอื่นๆ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำผลการทดสอบไปช่วยในการวินิจฉัยแก่แพทย์และให้บริการผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ทั้งนี้ในการศึกษาวิจัยนี้ปราศจากการได้รับผลประโยชน์ใดๆ จากบริษัทผู้ผลิตชุดการทดสอบทั้งสิ้น

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในงานวิจัย คือ ผู้ป่วยในผู้ป่วยนอก และผู้ตรวจสุขภาพของโรงพยาบาลรามาริบัติที่ส่งตรวจ TSHR antibodies มายังห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ ตัวอย่างส่งตรวจที่เป็นซีรัม ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส และมีเกณฑ์การคัดเข้า

คือ มีปริมาณของซีรัมเหลือมากกว่า 300 ไมโครลิตร ไม่มีการ hemolysis, icteric และ lipemic โดยนำตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์การคัดเข้าจำนวน 309 ราย มารับ study no. ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบหา TSHR antibodies ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ ATSHR หลักการ electrochemiluminescence immunoassay และเครื่องตรวจวิเคราะห์ TRAb หลักการ chemiluminescent microparticle immunoassay การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติโดยคณะกรรมการสิทธิมนุษยชนที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยเกี่ยวกับมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล (COA. MURA 2022/291)

การวิเคราะห์หาค่า TSHR antibodies

นำตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์หา TSHR antibodies ด้วยชุดการทดสอบ ATSHR แล้วไปตรวจวิเคราะห์หา TSHR antibodies ด้วยชุดการทดสอบ TRAb โดยคุณสมบัติของทั้งสองวิธีแสดงใน Table 1 จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้มาเปรียบเทียบค่าทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์และความสอดคล้องของทั้งสองวิธี

หลักการ electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Roche Diagnosis: Cobas E 801 (ATSHR) ทำโดยการบ่มซีรัมด้วย pretreatment buffer solution และ pretreatment reagent buffer ที่ประกอบด้วย pre-formed immunocomplex ของ pTSHR และ biotinylated anti-porcine TSHR mouse monoclonal antibody โดย TSHR antibodies ในซีรัมจะทำปฏิกิริยากับ TSHR complex ได้เป็น bound TSHR antibodies เติมสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อกำจัด TSHR antibodies ส่วนเกินออกไป แล้วเติม streptavidin-coated

Table 1 Performance specification of ATSHR and TRAb method for TSHR antibodies.

Performance indicator	ATSHR	TRAb
Assay procedure	Sample volume: 100 μ L Dilution: 1:5-1:10 Assay time: 27 min	Sample volume: 100 μ L Dilution: 1:10 Assay time: 29 min
Sample type	Serum	Serum
Reagent	Manual for pretreatment preparation	Ready to use
Cutoff of Graves' disease	1.75 IU/L	3.10 IU/L
Measurement range	0.80-40.00 IU/L	0.70-50.00 IU/L
Detection Limit*	LoB = 0.5 IU/L LoD = 0.8 IU/L LoQ = 1.1 IU/L	LoB = 0.38 IU/L LoD = 0.70 IU/L LoQ = 1.26 IU/L
Manufacturer's precision (%CV)**	Within-run: THYRO 1 = 3.7 THYRO 2 = 2.0 Between-run: THYRO 1 = 5.9 THYRO 2 = 2.6	Within-run: Low control = 4.8 Medium control = 1.8 High control = 1.1 Within-Laboratory (total)***: Low control = 5.2 Medium control = 2.0 High control = 1.2
Cross-reactant	Anti-TG <4000 IU/mL Anti-TPO <600 IU/mL LH <10000 mIU/mL FSH <10000 mIU/mL	Anti-TG <4000 IU/mL Anti-TPO <600 IU/mL LH <10000 mIU/mL FSH <10000 mIU/mL TSH <1000 μ IU/mL hCG <1000000 mIU/mL IgG <3 g/dL IgM <1 g/dL

* LoB = Limit of Blank; LoD = Limit of Detection; LoQ = Limit of Quantitation with a total allowable error of $\leq 20\%$

** CV = Coefficient of Variation

*** Includes within-run, between-run and between-day variability

microparticles และ human thyroid stimulating monoclonal autoantibody (M22) ที่ติดฉลากกับ ruthenium complex ส่วนของ bound TSHR antibodies จะถูกตรวจวัดได้จากความสามารถในการยับยั้งการจับกันของ labeled M22 โดย complex จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะจับกันอยู่ที่ solid phase ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะถูกดูไปยัง measuring cell ซึ่งมี microparticles ติดไว้บนพื้นผิว จากนั้นปฏิกิริยาส่วนเกินจะถูกล้างออกด้วย ProCell II M จากนั้นความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นจะชักนำให้มีการปล่อยสาร chemiluminescence ออกมาซึ่งจะตรวจวัดได้โดย photomultiplier ผลที่ตรวจวัดได้นำไปคำนวณค่า TSHR antibodies จาก 2-points calibration curve

หลักการ chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Abbott Laboratories: Alinity i (TRAb) เป็นการทดสอบ third generation assay เพื่อตรวจหา TSHR antibodies โดยการใช้ human thyroid-stimulating monoclonal antibody M22 การทดสอบนี้เป็นการทดสอบแบบ delayed one-step immunoassay โดยการบ่มซีรัมกับ immunoglobulin class G (IgG) (mouse monoclonal) ที่เคลือบบน paramagnetic microparticles และ assay diluent (ประกอบด้วย recombinant TSHR) รวมกัน จากนั้น TSHR antibodies ในซีรัมจะแย่งกันกับ

TSHR M22 antibody เพื่อเข้าจับกับ receptor ที่อยู่บน microparticles เติม acridinium-labeled conjugate ลงไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา บ่มต่อจนปฏิกิริยาลิ้นสุด จากนั้นล้างปฏิกิริยาส่วนเกินออกโดยการเติม pre-trigger และ trigger solution ตรวจวัด chemiluminescent ที่ปล่อยออกมาเป็น relative light unit (RLU) ค่าของ TSHR antibodies ในซีรัม จะมีความสัมพันธ์โดยอ้อมกับ RLU ที่ตรวจวัดได้โดยระบบการวัดแสงของเครื่อง ผลที่ตรวจวัดได้นำไปคำนวณค่า TSHR antibodies จาก 4 parameter logistic curve data reduction method (4PLC, Y-weighted)

การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

ทดสอบโดยการทำ between run precision เพื่อหาค่า TSHR antibodies ในแต่ละวิธี โดย ATSHR ใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ 2 ระดับ ได้แก่ ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิด THYRO 1 และ THYRO 2 ส่วน TRAb ใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ 3 ระดับ ได้แก่ Low control, Medium control และ High control โดยค่าความเข้มข้นของ TSHR antibodies ในแต่ละตัวอย่างควบคุมคุณภาพแสดงใน Table 2 จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV)

Table 2 Concentration of TSHR antibodies' internal quality control.

Internal quality control		Concentration of TSHR antibodies (IU/L)
ATSHR	THYRO 1	4.00
	THYRO 2	16.00
TRAb	Low control	3.00
	Medium control	10.00
	High control	30.00

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบผลการทดสอบค่า TSHR antibodies ของ ATSHR และ TRAb โดยใช้สถิติ Kolmogorov-Smirnov และ Box and Whisker plot เพื่อทดสอบและดูแนวโน้มการกระจายตัวของข้อมูล ใช้สถิติสหสัมพันธ์สเปียร์แมน (Spearman's correlation coefficient) และ scatter plot ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของผลการทดสอบ ใช้ Cohen's kappa coefficient เป็นสถิติในการเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีการทดสอบ โดยค่า Cohen's kappa coefficient คือ <0.00, 0.00-0.20, 0.21-0.40, 0.41-0.60, 0.61-0.80 และ 0.81-1.00 บ่งชี้ระดับความสอดคล้อง ไม่มีความสอดคล้อง ความสอดคล้องเล็กน้อย ความสอดคล้องพอใช้ ความสอดคล้องปานกลาง ความสอดคล้องดี และความสอดคล้องดีมาก ตามลำดับ (Table 3) และใช้ Bland-Altman plot ในการทดสอบความสอดคล้องของแต่ละตัวอย่าง (good agreement) โดยโปรแกรม MedCalc® Statistical Software version 20.111

ผลการวิจัย

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์ค่า TSHR antibodies ระหว่าง ATSHR และ TRAb

จากผลการทดสอบหาค่า TSHR antibodies

ในกลุ่มตัวอย่าง 309 ราย พบว่าวิธี ATSHR มีค่า TSHR antibodies อยู่ระหว่าง 0.81-39.50 IU/L ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.84 ± 7.25 IU/L ส่วนวิธี TRAb มีค่า TSHR antibodies อยู่ระหว่าง 0.82-48.34 IU/L ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.18 ± 8.26 IU/L และมีแนวโน้มการกระจายตัวของผลการทดสอบดังแสดงใน Box and Whisker plot (Fig. 1 และ Table 4) เมื่อนำผลการทดสอบจากทั้งสองวิธีมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของผลการทดสอบพบว่าจาก scatter plot ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.962 (Fig. 2) เมื่อนำผลการทดสอบมาทดสอบทางสถิติ พบว่ามีค่าสถิติสหสัมพันธ์สเปียร์แมน (Spearman's correlation coefficient) ที่ r เท่ากับ 0.958 ค่า Cohen's kappa coefficient เท่ากับ 0.865 (Table 5) และจาก Bland-Altman plot (Fig. 3) พบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบของแต่ละตัวอย่างเมื่อทดสอบด้วย ATSHR และ TRAb เท่ากับ -1.3 IU/L มีช่วงของความแตกต่างของค่าการทดสอบที่ยอมรับได้ (limit of agreement: LoA) เท่ากับ (-6.1)-3.4 IU/L และเมื่อนำผลการทดสอบมาแปลผลโดยการใช้ cutoff ของ Graves' disease เป็นเกณฑ์ ซึ่งในแต่ละวิธี จะมีค่า cutoff ของ Graves' disease ที่แตกต่างกัน โดย ATSHR มีค่า cutoff เท่ากับ 1.75 IU/L⁽¹⁴⁾

Table 3 Statistics of Cohen's kappa coefficient.

Statistics	Value
<0.00	Agreement equivalent to chance
0.00-0.20	Slight agreement
0.21-0.40	Fair agreement
0.41-0.60	Moderate agreement
0.61-0.80	Substantial agreement
0.81-1.00	Near perfect agreement (1.00 = Perfect agreement)

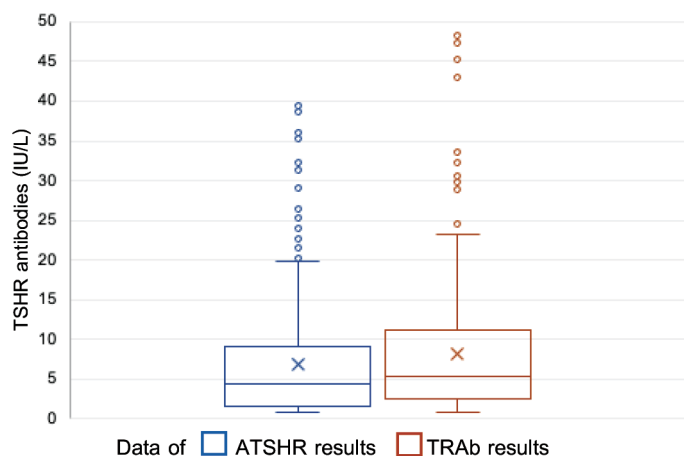


Fig. 1 Box and Whisker plot of ATSHR results and TRAb results.

Table 4 Statistics of Box and Whisker plot.

Statistics	ATSHR (IU/L)	TRAb (IU/L)
Min	0.81	0.82
Max	39.50	48.34
Mean	6.84	8.18
Median	4.38	5.44
Lower quartile (Q1)	1.62	2.54
Upper quartile (Q3)	9.03	11.10

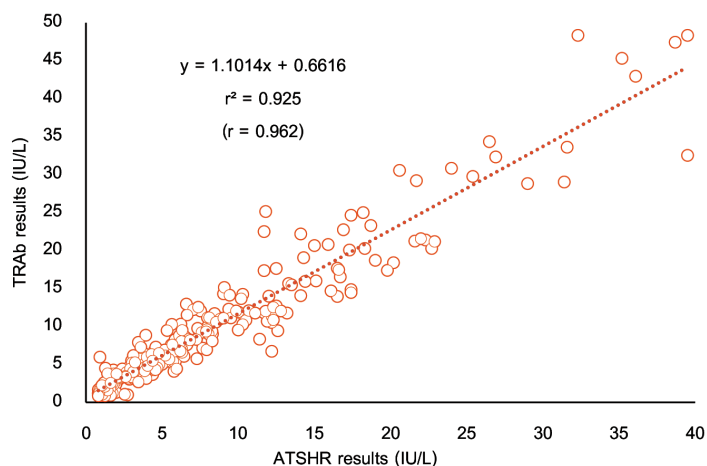


Fig. 2 Scatter plot of the results for TSHR antibodies between TRAb and ATSHR.

Table 5 Symmetric Measures of TSHR antibodies between ATSHR and TRAb by MedCalc® Statistical Software version 20.111

Statistics	Value
Spearman's correlation (Spearman's correlation coefficient)	0.958
Kappa (Cohen's kappa coefficient)	0.865

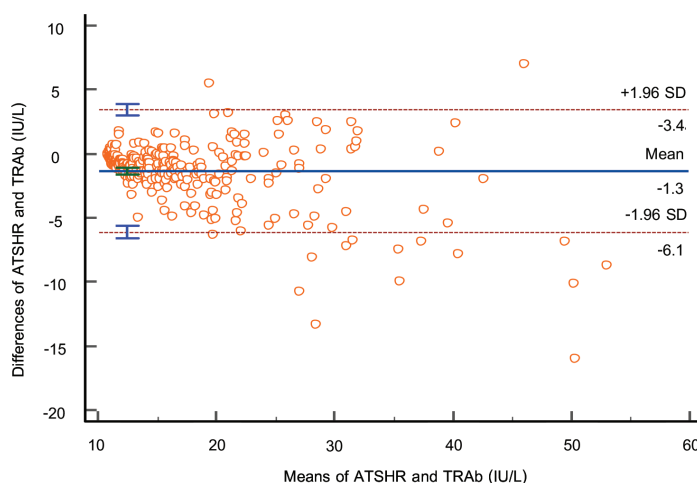


Fig. 3 Bland-Altman plot between means of ATSHR and TRAb and Differences of ATSHR and TRAb. The graph shows means of difference and limits of agreement (LoA)

ส่วน TRAb มีค่า cutoff เท่ากับ 3.10 IU/L⁽¹⁵⁾ พบว่าผลการทดสอบมีผลรวมความสอดคล้องของทั้งสองวิธีอยู่ที่ร้อยละ 94.50 ((309-17)/309) โดยผลบวกมีความสอดคล้องร้อยละ 94.67 (213/225) ทั้งสองวิธีให้ผลบวกตรงกัน 213 ราย ผลลบมีความสอดคล้องร้อยละ 94.05 (79/84) ทั้งสองวิธีให้ผลลบ

ตรงกัน 79 ราย (Table 6) นอกจากนี้มีตัวอย่างจำนวน 17 รายที่ให้ผลการทดสอบไม่ตรงกันระหว่างสองวิธี โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ในกลุ่มแรกมี 5 รายที่ ATSHR แปลผลการทดสอบได้เป็นลบแต่ TRAb แปลผลการทดสอบได้เป็นบวก โดยทั้ง 5 รายได้ค่า TSHR antibodies ของ ATSHR อยู่ที่ 0.92-1.66

Table 6 Qualitative comparison of ATSHR and TRAb.

ATSHR	No. of sample	TRAb	
		Positive	Negative
Positive	225	213	12
Negative	84	5	79
Total	309	218	91

IU/L ส่วนของ TRAb อยู่ที่ 3.56-5.95 IU/L ส่วน โดยทั้ง 12 รายได้ค่า TSHR antibodies ของ กลุ่มที่สองมี 12 รายที่ ATSHR แปลผลการทดสอบ ATSHR อยู่ที่ 1.76-3.44 IU/L ส่วนของ TRAb ได้เป็นบวก แต่ TRAb แปลผลการทดสอบได้เป็นลบ อยู่ที่ 0.96-3.01 IU/L (Table 7)

Table 7 Discordant results of ATSHR versus TRAb

No.	ATSHR		TRAb	
	TSHR antibodies (IU/L)	Results	TSHR antibodies (IU/L)	Results
1	1.28	Negative	4.47	Positive
2	1.66	Negative	3.92	Positive
3	0.92	Negative	5.95	Positive
4	1.58	Negative	3.56	Positive
5	1.41	Negative	3.79	Positive
6	1.89	Positive	2.69	Negative
7	1.98	Positive	2.41	Negative
8	1.76	Positive	2.59	Negative
9	2.74	Positive	0.96	Negative
10	2.04	Positive	2.93	Negative
11	2.86	Positive	3.01	Negative
12	2.12	Positive	2.97	Negative
13	1.79	Positive	2.54	Negative
14	1.98	Positive	1.28	Negative
15	1.82	Positive	2.33	Negative
16	2.55	Positive	1.05	Negative
17	3.44	Positive	2.69	Negative

การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

จากการทดสอบ within-run precision ของทั้งสองหลักการ พบว่าในตัวอย่างควบคุมคุณภาพ ชนิด THYRO 1 และ THYRO 2 ของ ATSHR ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 7.7

และ 2.2 ตามลำดับ ส่วน TRAb ในตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิด Low control, Medium control และ High control ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 5.0, 1.6 และ 1.0 ตามลำดับ (Table 8)

Table 8 Coefficient of Variations (%) obtained using ATSHR and TRAb

Method	Within-run precision											
ATSHR	THYRO 1				THYRO 2							
	Mean (IU/L)	SD	CV (%)	Target CV (%)	Mean (IU/L)	SD	CV (%)	Target CV (%)				
	3.247	0.249	7.7	<9.9	14.46	0.330	2.2	<10.0				
TRAb	Low control				Medium control				High control			
	Mean (IU/L)	SD	CV (%)	Target CV (%)	Mean (IU/L)	SD	CV (%)	Target CV (%)	Mean (IU/L)	SD	CV (%)	Target CV (%)
	2.906	0.146	5.0	<10.0	9.863	0.160	1.6	<10.0	30.06	0.287	1.0	<10.0

สรุปและวิจารณ์

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาผลการตรวจวิเคราะห์ TSHR antibodies โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดสอบ 2 วิธี คือ ATSHR และ TRAb ผลการศึกษาจากตัวอย่างจำนวน 309 ราย พบว่าความสัมพันธ์ของ ATSHR และ TRAb มีแนวโน้มของความสัมพันธ์ที่ดีและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยผลการทดสอบแสดงค่าความสัมพันธ์ที่สูงมาก (r , scatter plot = 0.962 และ r , spearman's correlation coefficient = 0.958) มีค่าความสอดคล้องของวิธีการทดสอบอยู่ในระดับดีมาก (Kappa = 0.865) และจาก Bland-Altman plot พบว่าผลการทดสอบมีความสอดคล้องของแต่ละตัวอย่างที่ดี (good agreement) โดย 95% ของช่วงผลการทดสอบที่ยอมรับได้มีค่าความแตกต่างอยู่ระหว่าง (-6.1)-3.4 IU/L โดยในผลการทดสอบที่มีค่าต่ำจะมีความสอดคล้องกันมากกว่าในผลการทดสอบที่มีค่าสูง ดังนั้นในผลการทดสอบที่มีค่าสูงอาจเกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดสอบได้ซึ่งอาจทำให้เกิดผลการทดสอบที่ไม่ตรงกันในสองวิธี และเมื่อนำค่า cutoff ของ Graves' disease มาเป็นเกณฑ์ในการแปลผลการทดสอบ พบว่าผลการทดสอบมีผล

รวมของความสอดคล้องของทั้งสองวิธีอยู่ที่ร้อยละ 94.50 สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบไม่ตรงกันจำนวน 17 ราย เมื่อได้ติดตามการวินิจฉัยของแพทย์พบว่าผู้ป่วยทุกรายมีภาวะ hyperthyroidism โดยในตัวอย่างที่ 1, 2, 4, 10, 11 และ 17 ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค Graves' disease แต่เนื่องจากการศึกษานี้มีข้อจำกัดในการสืบค้นข้อมูลทางคลินิกของคนไข้บางรายจึงทำให้ไม่สามารถยืนยันการแปลผลการทดสอบที่ชัดเจนได้ ผลการทดสอบที่ไม่ตรงกันจากทั้งสองกลุ่มอาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนของการตรวจวิเคราะห์ซึ่งสังเกตได้ว่าผลการทดสอบ TSHR antibodies ของทั้ง ATSHR และ TRAb ที่ได้อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับค่า cutoff ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบที่ไม่ตรงกันมีอัตราส่วนของค่า TSHR antibodies กับค่า cutoff ของ ATSHR อยู่ระหว่าง 0.53-1.97 และของ TRAb อยู่ระหว่าง 0.31-1.92 (Table 9) และอาจเกิดจากข้อแตกต่างในการตรวจวิเคราะห์ เช่น ความแตกต่างของหลักการในการตรวจวิเคราะห์ การใช้ตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสมาละลายเพื่อทำการทดสอบใหม่ในสภาพแวดล้อมและวันเวลาที่ต่างกัน รวมถึงมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องเนื่องมาจาก

Table 9 Ratio of TSHR antibodies results (IU/L) and cutoff of Graves' disease

No.	Ratio of TSHR antibodies results (IU/L) and Cutoff of Graves' disease	
	ATSHR (cutoff = 1.75 IU/L)	TRAb (cutoff = 3.10 IU/L)
1	0.73	1.44
2	0.95	1.26
3	0.53	1.92
4	0.90	1.15
5	0.81	1.22
6	1.08	0.87
7	1.13	0.78
8	1.01	0.84
9	1.57	0.31
10	1.17	0.95
11	1.63	0.97
12	1.21	0.96
13	1.02	0.82
14	1.13	0.41
15	1.04	0.75
16	1.46	0.34
17	1.97	0.87

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบด้วย เช่น ในผู้ป่วยที่เคยได้รับ mouse monoclonal antibody เพื่อการวินิจฉัยหรือการรักษาอาจประกอบด้วย human anti-mouse antibody (HAMA) ซึ่งเป็น heterophil antibodies ที่สามารถรบกวนการตรวจวิเคราะห์ทาง immunoassays ได้ สำหรับ immunoassays เป็นหลักการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหาและตรวจวัดปริมาณสารในตัวอย่างทางชีววิทยา ถึงแม้ว่าจะมีความเสี่ยงที่จะเกิดข้อผิดพลาดในการตรวจวิเคราะห์ที่เกิดจากการถูกรบกวนของสารตัวอย่าง โดย human anti-

animal immunoglobulins ใน immunoassays ที่ใช้ animal immunoglobulins สามารถทำให้เกิดได้ทั้งผลสูงปลอมที่เกิดจากการจับกันของแอนติบอดีที่ไม่พึงประสงค์ในขั้นตอนของการเกิดปฏิกิริยาและขั้นตอนของการตรวจวัดค่าการทดสอบ และผลต่ำปลอมที่เกิดจากการถูกรบกวนการจับกันของแอนติบอดีในขั้นตอนการตรวจวัดค่าการทดสอบได้ทั้งนี้ตัวอย่างดังกล่าวจึงอาจให้ผลสูงปลอมหรือผลต่ำปลอมได้เมื่อนำมาทดสอบด้วยชุดการทดสอบที่มีการใช้ mouse monoclonal antibody⁽¹⁶⁻²¹⁾ ซึ่งทั้ง

ATSHR และ TRAb ถือเป็นชุดการทดสอบที่มีการใช้ mouse monoclonal antibody ในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองวิธี และยังพบการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะ hyperthyroidism ที่ตรวจไม่พบ TSHR antibodies แต่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค Graves' disease อีกด้วย⁽²²⁾ ดังนั้นจึงควรนำผลการตรวจวิเคราะห์ TSHR antibodies พิจารณาร่วมกับค่าการทดสอบอื่นๆ ของต่อมไทรอยด์ (thyroid functions test) และอาการทางคลินิกในการประกอบการวินิจฉัยโรคเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรค Graves' disease ให้ถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น

ส่วนการทดสอบความแม่นยำ (precision) พบว่าทั้ง ATSHR และ TRAb มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของตัวอย่างควบคุมคุณภาพในแต่ละชนิดอยู่ในเกณฑ์ (target %CV)^(23, 24) ที่ยอมรับได้ คือ ATSHR THYRO 1 เท่ากับ 7.7 (target %CV <9.9), ATSHR THYRO 2 เท่ากับ 2.2 (target %CV <10.0), TRAb Low control เท่ากับ 5.0 (target %CV <10.0), TRAb Medium control เท่ากับ 1.6 (target %CV <10.0) และ TRAb High control เท่ากับ 1.0 (target %CV <10.0) (Table 8) แสดงให้เห็นได้ว่าทั้งสองชุดการทดสอบมีความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์หาค่า TSHR antibodies ที่ดีและอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ทั้งนี้เนื่องจากทั้งสองชุดการทดสอบมีความแตกต่างกันของตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่นำมาทำการทดสอบจึงไม่สามารถนำค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่มีความเข้มข้นของ TSHR antibodies ที่มีช่วงค่าใกล้เคียงกับค่าสำคัญที่ใช้เพื่อการวินิจฉัยทางคลินิกหรือค่า cutoff ซึ่ง ATSHR มีค่าเท่ากับ 1.75 IU/L ส่วน TRAb มีค่าเท่ากับ 3.10 IU/L โดยตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

ของ ATSHR ที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่า cutoff ได้แก่ THYRO 1 มีค่าเท่ากับ 3.247 IU/L และของ TRAb ได้แก่ Low control มีค่าเท่ากับ 2.906 IU/L ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 7.7 และ 5.0 ตามลำดับ (Table 8) ทั้งนี้จึงเป็นที่สังเกตได้ว่าในช่วงค่าของ TSHR antibodies ที่ใกล้เคียงกับค่าสำคัญที่ใช้เพื่อการวินิจฉัยทางคลินิก ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ TRAb มีค่าต่ำกว่า ATSHR อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดในการศึกษาครั้งนี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าชุดการทดสอบใดมีความแม่นยำมากกว่า

จากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าหลักการ electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Roche Diagnosis: Cobas E 801 (ATSHR) และหลักการ chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์ Abbott Laboratories: Alinity i (TRAb) สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาค่า TSHR antibodies ทดแทนกันได้เนื่องจากมีค่าความสัมพันธ์และความสอดคล้องกันอยู่ในระดับดีมาก ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการจึงควรพิจารณาคุณสมบัติและข้อดี-ข้อเสียด้านอื่นเพื่อการเลือกใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์หาค่า TSHR antibodies ร่วมด้วย เช่น ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ ลักษณะของน้ำยาที่ใช้เป็นแบบพร้อมใช้หรือต้องมีการเตรียมแบบ manual ก่อนการใช้งานเนื่องจากหากมีขั้นตอนของการเตรียมน้ำยาแบบ manual อาจก่อให้เกิด human error ขึ้นในกระบวนการก่อนการตรวจวิเคราะห์ (pre-analysis) ได้ รวมทั้งช่วงความเข้มข้นที่เครื่องตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจวัดค่าได้ (measurement range) เพราะขอบเขตของการตรวจวัดค่าที่กว้างกว่าจะทำให้สามารถรายงานผลการทดสอบได้ในช่วงค่าที่กว้างกว่าเช่นกัน (Table 1) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์หาค่า TSHR

antibodies ไม่มีวิธีมาตรฐานอ้างอิง (standard method) ประกอบกับทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันของหลักการการทดสอบและค่า cutoff ของ Graves' disease จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการทดสอบกันได้โดยตรง ในอนาคตทางห้องปฏิบัติการจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการหาวิธีการที่จะสามารถนำผลการทดสอบมาเปรียบเทียบค่ากันได้โดยตรงในมาตรฐานเดียวกัน การศึกษาประสิทธิภาพการแปลผลการทดสอบของค่า cutoff ของแต่ละวิธี และการศึกษาเปรียบเทียบความแม่นยำระหว่างชุดการทดสอบของทั้งสองวิธีโดยตรง รวมถึงการหาช่วงอ้างอิงของค่า TSHR antibodies ของตนเองตามลักษณะเฉพาะของแต่ละห้องที่และกลุ่มประชากร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.พุทธภูมิ ลำเจียกเทศ ผศ.ดร.นายแพทย์ อภิรมย์ วงศ์สกุลยานนท์ คุณชัชวาล เศรษฐอุดม คุณอนุชาติ อ่วมขันธ์ คุณอริยา วัฒนอมศักดิ์ยุทธ และผู้ปฏิบัติการหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอบคุณบริษัท แอ็บบอดิลาบอเรตอรีส จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องตรวจวิเคราะห์ Alinity i และชุดการทดสอบ TRAb ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Barbesino G, Tomer Y. Clinical review: Clinical utility of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2247-55.
2. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev* 2003; 24: 802-35.
3. Schott M, Hermesen D, Broecker-Preuss M, *et al.* Clinical value of the first automated TSH receptor autoantibody assay for the diagnosis of Graves' disease (GD): an international multicentre trial. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71: 566-73.
4. Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TSH receptor autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2009; 9: 113-6.
5. Chiamolera MI, Wondisford FE. Mini-review: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 2009; 150: 1091-6.
6. Paunkovic J, Paunkovic N. Does autoantibody-negative Graves' disease exist? A second evaluation of the clinical diagnosis. *Horm Metab Res* 2006; 38: 53-6.
7. Sturniolo G, Gagliano E, Tonante A, Taranto F, Vermiglio F, Sturniolo G. Toxic multinodular goitre. Personal case histories and literature review. *G Chir* 2013; 34: 257-9.
8. Quadbeck B, Hoermann R, Roggenbuck U, *et al.* Sensitive thyrotropin and thyrotropin-receptor antibody determinations one month after discontinuation of anti-thyroid drug treatment as predictors of relapse in Graves' disease. *Thyroid* 2005; 15: 1047-54.

9. Okamoto Y. [TSH receptor antibody measurements--the progress and the point at issue]. *Nihon Rinsho* 2006; 64: 2219-26.
10. Zophel K, Wunderlich G, Kopprasch C, Koch R, Franke WG, Kotzerke J. [Predictive value of thyrotropin receptor antibodies using the second generation TRAb human assay after radioiodine treatment in Graves' disease]. *Nuklearmedizin* 2003; 42: 63-70.
11. Matthews DC, Syed AA. The role of TSH receptor antibodies in the management of Graves' disease. *Eur J Intern Med* 2011; 22: 213-6.
12. Sanders J, Evans M, Premawardhana LD, *et al.* Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *Lancet* 2003; 362: 126-8.
13. Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, *et al.* Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor: sequence structure and function. *Thyroid* 2004; 14: 560-70.
14. Roche Diagnosi. Elecsys Anti-TSHR package insert. Germany; 2021.
15. Abbott Laboratories. TRAb package insert. Ireland; 2020.
16. Primus FJ, Kelley EA, Hansen HJ, Goldenberg DM. "Sandwich"-type immunoassay of carcinoembryonic antigen in patients receiving murine monoclonal antibodies for diagnosis and therapy. *Clin Chem* 1988; 34: 261-4.
17. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC, Jr. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* 1985; 45: 879-85.
18. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem* 1999; 45: 942-56.
19. Bergman D, Larsson A, Hansson-Hamlin H, Ahlen E, Holst BS. Characterization of canine anti-mouse antibodies highlights that multiple strategies are needed to combat immunoassay interference. *Sci Rep* 2019; 9: 14521.
20. Bjerner J. Human anti-immunoglobulin antibodies interfering in immunometric assays. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65: 349-64.
21. Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem* 1988; 34: 27-33.
22. Scatti Regas A, Pujol Borrell R, Ferrer Costa R, Puerto Carranza E, Clemente Leon M. [Graves disease with negative TSH receptor antibodies: A presentation of 5 cases]. *An Pediatr (Engl Ed)* 2020; 93: 417-9.
23. Roche Diagnosis. Simple Precision by EP Evaluator 11.3.0.23 package insert. Thailand; 2018.
24. Abbott Laboratories. PRODUCT REQUIREMENT Alinity i TRAb package insert. Ireland; 2021.