

ความสอดคล้องของระดับเฟอร์ริตินในเลือดระหว่างการไม่เจาะจางตัวอย่าง และการเจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

วรวรรณ วสุโสภาพล วท.บ., กฤตภัค หอเจริญ วท.ม.

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลนครพิงค์

ส่งบทความ: 17 เม.ย. 2565

แก้ไขบทความ: 28 มิ.ย. 2565

ตีพิมพ์บทความ: 29 มิ.ย. 2565

บทคัดย่อ

ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบปัญหาทำให้ต้องเจาะจางตัวอย่างและทำการวิเคราะห์ซ้ำเนื่องจากค่าสูงเกินความสามารถในการวิเคราะห์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสอดคล้องของระดับเฟอร์ริตินในเลือดด้วยวิธีการเจาะจางกับการไม่เจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

วิธีการศึกษา: แบบ Cross-sectional diagnostic study การวิเคราะห์หาระดับเฟอร์ริตินในเลือด ด้วยหลักการ Immunoturbidimetric โดยมีระดับการเจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า, 3 เท่า และ 4 เท่า เทียบกับกลุ่มที่ไม่เจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา สถิติสหสัมพันธ์สเปียร์แมนและการถดถอยเชิงเส้น สถิติ Paired t-test และสถิติ Wilcoxon signed rank test เพื่อทดสอบความแตกต่างของระดับเฟอร์ริติน, สถิติแคปปา (Kappa) และ ROC เพื่อทดสอบความสอดคล้องและความถูกต้องตามลำดับ

ผลการศึกษา: จำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 138 ราย เป็นเพศหญิง 84 ราย (ร้อยละ 60.9) เพศชาย 54 ราย (ร้อยละ 39.13) อายุเฉลี่ยส่วนใหญ่ 61-81 ปี พบความสัมพันธ์ของระดับเฟอร์ริตินในกลุ่มที่เจาะจางกับไม่เจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2,3 และ 4 เท่า มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(r) เท่ากับ 0.994, 0.989, 0.977 ($P < 0.01$) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เจาะจางพบว่า กลุ่มที่เจาะจาง 2 เท่า ได้ความแตกต่างน้อยที่สุด (Mean Diff -24.74, $P < 0.01$) และมีความสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kappa=0.898, $p < 0.01$) ที่ระดับความผิดพลาดไม่เกิน 5% และมี Sensitivity 90.90%, Specificity 100.00%, PPV 100%, NPV 89.7%, AUC= 94.90% (95%CI 0.912 - 0.985) การเจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริตินในเลือด 2 เท่า สามารถเพิ่มความสามารถในการวิเคราะห์เป็น 1,000 ng/ml. และสามารถลดการทำซ้ำได้ 744 รายจากทั้งหมด 4,012 ราย(ร้อยละ18.5) และการเจาะจาง 3 และ 4 เท่า เพิ่มความสามารถการวิเคราะห์ได้ถึง 1,500 และ 2,000 ng/ml.

สรุปผลและวิจารณ์: การเจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริตินในเลือด 2 เท่า สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้สอดคล้อง ในระดับดีมาก และสามารถลดการทำซ้ำได้ แต่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยกับกลุ่มไม่เจาะจางมากขึ้นตามการเจาะจางด้วย การนำมาใช้ควรประเมินความแตกต่างผลการวิเคราะห์ร่วมกับแพทย์ผู้รักษา

คำสำคัญ: เฟอร์ริตินในเลือด, การเจาะจางก่อนการวิเคราะห์

ติดต่อบทความ

วรวรรณ วสุโสภาพล, นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก,
โรงพยาบาลนครพิงค์

E-mail: worawan_koy@hotmail.com

A Consistency Study of Blood Ferritin Levels between the Preanalytical Dilution Versus Non-Dilution

Submitted: 17 Apr 2022

Revised: 28 Jun 2022

Published: 29 Jun 2022

Worrawan Wasusophaphon B.S., Krittapak Hawjarearn B.M.

Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Nakornping Hospital, Chiang mai

Background: Analytical for the determination of blood ferritin levels in our laboratory, we had to dilute and re-analyze samples when the value was over the measurement interval. The objective of this study was to study the consistency of blood ferritin levels between the preanalytical dilution versus non-dilution technique.

Method: Cross-sectional diagnostic study was performed in the analysis of the Immunospectrophotometric principle of blood ferritin. There were 2x, 3x, and 4x dilution of the preanalytical dilution compared to the non-diluted group. Data were analyzed with descriptive statistics, Spearman correlation statistics and linear regression analysis for correlations, Paired t-test statistics to test the difference in mean ferritin levels, Wilcoxon signed rank test, Kappa statistics and ROC to test the consistency and assess the accuracy of the interpretations.

Results: A total of 138 samples, there were 84 female (60.9%), 54 males (39.13%), average ages 61-81 years old. The study had found a correlation between blood ferritin levels in the preanalytical diluted and non-diluted samples before analysis. The correlation coefficients (r) in preanalytical diluted samples at 2x, 3x and 4x dilution were 0.994, 0.989, 0.977 ($P < 0.01$), respectively. The difference of the sample dilution at 2x had the least difference (Mean Diff -24.74, $P < 0.01$). When tested with Kappa, ferritin levels were statistically consistent (Kappa=0.898, 95%CI=0.825 – 0.971 ($p < 0.01$)). Sensitivity 90.90%, Specificity 100.00%, PPV 100%, NPV 89.7% and AUC= 94.90% (95%CI 0.912 - 0.985). A preanalytical dilution of 2x sample can reduce of diluted and repeated 744 of the 4,012 samples (18.5%). The pre-analysis of 3x and 4x sample dilution, the measurement interval can report value up to 1,500 ng/ml. and 2,000 ng/ml.

Conclusion: A preanalytical dilution of 2x sample was able to report with excellent agreement consistency level. However, there are increased in difference with more dilution samples. Technicians should coordinate with physicians and discuss with clinical scenario.

Keywords: Blood ferritin, Preanalytical dilution

Contact:

Worrawan Wasusophaphon, Medical Technologist, Department of Medical Laboratory and Clinical Pathology, Nakornping Hospital

E-mail: worrawan_koy@hotmail.com

บทนำ

ภาวะโลหิตจาง จากการขาดธาตุเหล็กเป็นภาวะพหุโภชนาการที่สำคัญและพบได้ทั่วโลก^[1]ในประเทศไทย เด็กเกือบ 40% ขาดธาตุเหล็ก^[2] และปัญหานี้พบในทุกกลุ่มอายุ โดยกลุ่มที่ยังมีปัญหามีผลกระทบต่อพัฒนาสุขภาพ เศรษฐกิจและสังคม คือเด็กและหญิงมีครรภ์^[3] ดังนั้น การวิเคราะห์หาระดับเฟอร์ริตินในเลือด จะมีส่วนช่วยในการวินิจฉัยโรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กในทางคลินิก มีประโยชน์ต่อการประเมินและตรวจติดตามภาวะโลหิตจางได้^[4] ภาวะโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก ตามเกณฑ์การวัดระดับเซรัมเฟอร์ริติน ถือว่า ค่าเซรัมเฟอร์ริติน < 12 ng/mL ในเด็กต่ำกว่า 5 ปี หรือ < 15 ng/mL ในเด็กมากกว่า 5 ปีขึ้นไปถึงวัยผู้ใหญ่ที่สุขภาพดีหรือไม่มีการอักเสบของร่างกาย และค่าเซรัมเฟอร์ริติน < 30 ng/mL ในเด็กต่ำกว่า 5 ปี หรือ < 70 ng/mL ในเด็กมากกว่า 5 ปีขึ้นไปถึงวัยผู้ใหญ่ที่มีการติดเชื้อหรือมีการอักเสบของร่างกาย ภาวะเหล็กเกิน ใช้ค่าค่าเซรัมเฟอร์ริตินในการวินิจฉัย ถือว่า ค่าเซรัมเฟอร์ริติน > 150 ng/mL ในผู้หญิง หรือ > 200 ng/mL ในผู้ชายที่สุขภาพดีและค่าเซรัมเฟอร์ริติน > 500 ng/mL ในคนที่มีปัญหาสุขภาพหรือมีโรคประจำตัว^[5-6]

ระดับเฟอร์ริตินทั้งค่าสูงและค่าต่ำ มีความสำคัญต่อการวินิจฉัยและรักษา เช่น การให้ยาธาตุเหล็กในคนที่มีภาวะโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก และกรณีระดับเฟอร์ริตินมีค่าสูง เช่นในโรคธาลัสซีเมียที่มีภาวะธาตุเหล็กเกิน ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการรักษาและติดตามระดับเฟอร์ริติน^[7-8]

เฟอร์ริติน (Ferritin) เป็นกลุ่มโมเลกุลที่จับตัวระหว่างเหล็กกับโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่าอะโปเฟอร์ริติน (Apo ferritin)

จะพบได้ในเซลล์ร่างกายเกือบทุกแห่ง เช่น เซลล์ของตับ ม้ามไขกระดูก ผนังลำไส้ และสามารถตรวจพบได้ในเลือด ซึ่งจะมีปริมาณเป็นสัดส่วนกับเหล็กที่ร่างกายสะสมไว้ (Iron storage)^[4]

การวิเคราะห์หาค่าเฟอร์ริติน ทางห้องปฏิบัติการเพื่อนำผลการวิเคราะห์ ไปใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคของแพทย์ สามารถทำการวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Immunoradiometric assay (IRMA), Immuno turbidimetric , Electro chemiluminescent assay (ECLIA) โดยวิธีที่นิยมในปัจจุบันคือ Immuno turbidimetric ซึ่งสามารถทำในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติด้านเคมีคลินิกได้ และ Electro chemiluminescent assay (ECLIA) สามารถทำในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติด้านอิมมูโนวิทยา

ในงานเคมีคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลนครพิงค์ ใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติบริษัท Abbott diagnostics รุ่น architect c8000 ด้วยน้ำยา Quantia Ferritin หลักการ Immuno turbidimetric โดยน้ำยา Quantia Ferritin เป็นสารแขวนลอยของอนุภาค polystyrene latex ที่มีรูปร่างขนาดเหมือนกัน เคลือบด้วย IgG anti-human ferritin จากกระต่าย เมื่อตัวอย่างตรวจที่มีเฟอร์ริติน ถูกผสมกับน้ำยาจะเกิดการจับตัวเป็นกลุ่มอย่างชัดเจน ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยวิธี Immuno turbidimetric ผลการวิเคราะห์เฟอร์ริตินแสดงเป็น ng/mL (อ้างอิงตามมาตรฐานสากล WHO) มีช่วงค่าอ้างอิงปกติเพศชาย 30 ถึง 300 ng/mL เพศหญิง 15 ถึง 160 ng/mL และมีความสามารถในการวิเคราะห์ (Linearity) 10.0-500.0 ng/mL^[9]

การวิเคราะห์ตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการที่ผ่านมาพบปัญหา มีหลายตัวอย่างที่ต้องมีการเจือจางด้วย normal saline และทำการวิเคราะห์ซ้ำ โดยเฉพาะรายที่มีภาวะธาตุเหล็กเกินในปิงปประมาณ 2563-2564 โรงพยาบาลนครพิงค์ มีการวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริตินในเลือดจำนวน 8,189 ราย พบต้องมีการเจือจางตัวอย่างและทำซ้ำจำนวน 4,012 ราย (ร้อยละ 49.0) ทำให้ระยะเวลารอคอยและต้นทุนการวิเคราะห์สูงขึ้น

ดังนั้น เพื่อให้กระบวนการวิเคราะห์ตัวอย่างและใช้ผลการวิเคราะห์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำเหมาะสมตามมาตรฐานที่กำหนด มีความรวดเร็ว ไม่ซ้ำซ้อนหลายครั้ง รวมทั้งประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ด้วย จึงมีวัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสอดคล้องของระดับเฟอร์ริตินในเลือด เมื่อทำการเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ในระดับ 2 เท่า 3 เท่า และ 4 เท่า เทียบกับกลุ่มอ้างอิงที่ไม่มีการเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และนำผลสรุปไปกำหนดวิธีปฏิบัติ (Work instruction) ที่เพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริตินทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้ง การให้ข้อเสนอแนะต่อการพัฒนาระบบบริการสุขภาพในระดับต่างๆ ต่อไป

วิธีการศึกษา

รูปแบบการวิจัย แบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional diagnostic study) ในกลุ่มตัวอย่างที่เฉพาะเจาะจงและเก็บข้อมูลไปข้างหน้า (Prospective data collection) ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือน มกราคม-พฤษภาคม 2564

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา เป็นผู้ป่วยที่มาเจาะเลือดทางหลอดเลือดดำ เพื่อตรวจวัดระดับเฟอร์ริตินในเลือดตามคำสั่ง

แพทย์ที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลนครพิงค์ จ.เชียงใหม่ ตั้งแต่เดือน มกราคม-พฤษภาคม 2564 โดยเจาะเลือดใส่หลอดเก็บเลือดชนิดไม่มีสารกันเลือดแข็ง โดยมีเกณฑ์คัดเลือกตัวอย่างดังนี้ 1. เลือดนั้นมีปริมาณซีรั่มมากกว่า 2 ml. 2. ตัวอย่างไม่มีลักษณะ hemolysis, icteric, lipemic 3. มีระดับเฟอร์ริตินอยู่ในช่วงที่เครื่องสามารถวัดค่าได้ 10.0-500.0 ng/ml. โดยแยกซีรั่มใส่หลอดพลาสติกขนาด 13x75 mm. ปริมาตร 2 ml. ปิดจุกพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ถึง -25 องศาเซลเซียส จนครบจำนวน 138 ตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง ได้จากการในโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม G*Power Version 3.1.9.4 ในสมการทดสอบความสัมพันธ์ โดยใช้ Correlation: Bivariate normal model กำหนดค่า Correlation ρ $H_0 = 0$, ρ $H_1 = 0.3$ กำหนดค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.3 ค่า alpha error = 0.05, power = 0.95 ได้จำนวนตัวอย่าง 138 ตัวอย่าง

เครื่องมือที่ใช้ เป็นแบบบันทึกข้อมูลที่สร้างขึ้นร่วมกับบัตรประจำตัวผู้ป่วยเพื่อบันทึกข้อมูล ส่วนบุคคล และลักษณะทางคลินิกของกลุ่มศึกษาการวินิจฉัยโรคและยาที่ได้รับจากระบบฐานข้อมูลของโรงพยาบาล และตัวอย่างเลือด โดยจำแนกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มอ้างอิง เป็นกลุ่มที่ไม่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

กลุ่มเปรียบเทียบ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 3 เท่า เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 4 เท่าโดยใช้ Normal saline (nss) เป็นสารเจือจาง

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย การควบคุมการวิจัย และการเก็บรวบรวมข้อมูล
นำตัวอย่างทั้งหมด 138 ตัวอย่าง มาแบ่งทำการวิเคราะห์วันละ 40 ตัวอย่าง เป็นเวลา 4 วัน

1. นำตัวอย่างออกมาจากช่องแช่แข็งครั้งละ 40 ตัวอย่าง วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นเขย่าให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex

2. นำหลอดพลาสติกขนาด 13x75 mm. มาจำนวน 160 หลอด แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 40 หลอด

3. กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มไม่เจ็บป่วยด้วยโรค ดูดซีรัมปริมาตร 100 μ L. โดยใช้ automatic pipette ใส่หลอดพลาสติก ที่ละ

4. กลุ่มที่ 2 เจือจางตัวอย่าง 2 เท่า โดยใช้ automatic pipette ดูดซีรัมปริมาตร 100 μ L ใส่หลอดพลาสติก และดูด

normal saline ปริมาตร 100 μ L. ใส่ตามไปผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex ทำที่ละ 1 หลอด/1 ราย จนครบ 40 หลอด

5. กลุ่มที่ 3 เจือจางตัวอย่าง 3 เท่า โดยใช้ automatic pipette ดูดซีรัมปริมาตร 100 μ L ใส่หลอดพลาสติก และดูด

normal saline ปริมาตร 200 μ L. ใส่ตามไปผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex ทำที่ละ 1 หลอด/1 ราย จนครบ 40 หลอด

6. กลุ่มที่ 4 เจือจางตัวอย่าง 4 เท่า โดยใช้ automatic pipette โดยดูดซีรัมปริมาตร 100 μ L ใส่หลอดพลาสติก และดูด

normal saline ปริมาตร 300 μ L. ใส่ตามไปผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex ทำที่ละ 1 หลอด/1 ราย จนครบ 40 หลอด

7. นำตัวอย่าง ทั้งหมด 160 หลอด เข้าเครื่องวิเคราะห์โดยเรียงลำดับตามกลุ่ม 1 กลุ่ม 2 กลุ่ม 3 และกลุ่มที่ 4 ทำการวิเคราะห์หา ระดับเฟอร์ริตินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

Abbott diagnostics รุ่น architect c8000 ด้วยน้ำยา Quantia Ferritin ref 6K41-02 ที่มีจัดเก็บน้ำยาที่ 2 ถึง 8°C ก่อนนำมาใช้งาน และมีการเปิดใช้งานอยู่บนเครื่องวิเคราะห์ ไม่เกิน 20 วัน น้ำยามีค่าความเป็นเส้นตรงของการวัด (Linearity) มีค่าตั้งแต่ 10.0 ถึง 500.0 ng/mL โดยไม่มีความสามารถในการทดสอบซ้ำแบบอัตโนมัติ หากค่าสูงกว่า Linearity ให้เจือจางตัวอย่างตรงลงในอัตรา 1:10 เมื่อค่าสูงกว่า 5,000 ng/mL เจือจาง 1: 50 ด้วยน้ำเกลือและทำการทดสอบซ้ำ และคูณผลด้วยแฟกเตอร์การเจือจาง การทดสอบนี้ไม่มีสารรบกวน ที่มีนัยสำคัญจากความขุ่น (lipemia) ที่ค่า triglyceride ความเข้มข้นถึง 490 mg/dL, ที่ค่า bilirubin ความเข้มข้นถึง 20.8 mg/dL และ ที่ค่า hemoglobin ความเข้มข้นถึง 480 mg/dL

8. บันทึกผลการวิเคราะห์ในรูปแบบเก็บข้อมูล และเก็บข้อมูล เพศ อายุ การวินิจฉัยโรคและยาที่ได้รับ จากระบบฐานข้อมูลของโรงพยาบาลร่วมด้วย

ในการวิเคราะห์จะใช้ช่วงค่าความผิดพลาดทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ (Total allowable error, TEa) ที่กำหนดโดย CLIA เป็นเกณฑ์ในการยอมรับสมรรถภาพของห้องปฏิบัติการ เนื่องจาก TEa แสดงค่าความผิดพลาด ทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ทั้งความไม่แม่นยำ (imprecision) และความไม่ถูกต้อง (inaccuracy) โดยค่าความผิดพลาดทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ (TEa) ของการทดสอบเฟอร์ริตินที่กำหนดโดย CLIA ในปี 2019 คือ 16.9%^[10]

การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลส่วนบุคคลและลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรที่ศึกษาเพื่อหา

ค่าความถี่ และค่าร้อยละ การทดสอบความสัมพันธ์ของกลุ่มใช้สถิติ Spearman's correlation และ Simple linear regression การทดสอบความแตกต่างของระดับเฟอร์ริตินใช้สถิติ Paired t-test และ Wilcoxon signed rank test การทดสอบความสอดคล้องในการแปลผลของทั้งสองกลุ่ม ใช้สถิติ แคปปา (Kappa statistic) และการประเมินความถูกต้องของการวินิจฉัยโรค ใช้สถิติ Receiver Operating Characteristic (ROC) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ($P < 0.05$) โดยมีจุดตัด (Cut-off point) ถือว่า normal เป็นช่วงค่าอ้างอิงปกติของทั้งเพศชาย และเพศหญิง (เพศชาย=30-300 ng/ml, เพศหญิง=15-160 ng/ml) และ โดยมีจุดตัด (Cut-off point) ถือว่า abnormal เป็นค่าที่อยู่นอกช่วงค่าอ้างอิงปกติ^[9]

ความสอดคล้องในการแปลผลของทั้งสองกลุ่ม โดยสถิติ แคปปา (Kappa statistic) ค่า Kappa > 0.81 -1.00 ถือว่ามีความสอดคล้องกันอย่างสมบูรณ์^[11]

การประเมินความถูกต้องของการวินิจฉัยโรค ใช้สถิติ Receiver Operating Characteristic (ROC) ระดับความสัมพันธ์ระหว่างค่า Area under the Receiver Operating Characteristics Curve (AUC_{ROC}) กับค่าที่ตรวจได้ (Diagnostic Value of a Biomarker) ค่าความสัมพันธ์ระดับดีมาก ที่ระดับ AUC_{ROC} > 0.9 ค่าความสัมพันธ์ระดับดีที่ระดับ AUC_{ROC} 0.75 – 0.9 ค่าความสัมพันธ์ระดับแย่ 0.5 – 0.75 และ ไม่มีคสามสัมพันธ์ที่ระดับ AUC_{ROC} < 0.5^[12]

การวิจัยครั้งนี้ ได้รับการรับรองจริยธรรมในการทำวิจัยในมนุษย์ ของโรงพยาบาลนครพิงค์ จ.เชียงใหม่ แล้ว

ผลการศึกษา

แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำเสนอลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริตินทางห้องปฏิบัติการ ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริติน ทางห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลนครพิงค์

	ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง	จำนวน (n=138)	%
Gender	Male	54	39.1
	Female	84	60.9
Age (year)	< 40	26	18.84
	41- 60	47	34.06
	61-80	54	39.13
	> 81	11	7.97
Diagnosis	Chronic Kidney Disorder	30	21.74
	Hypertension	9	6.52
	Pregnancy	8	5.80
	Thalassemia	8	5.80
	Iron Deficiency Anemia	6	4.34
	Other	77	55.80

ความสอดคล้องของระดับเฟอร์ริตินในเลือดระหว่างการไม่เจาะจางตัวอย่าง และการเจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

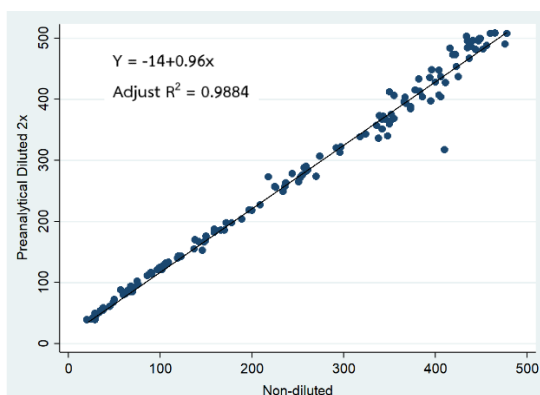
ตารางที่ 1 ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริติน ทางห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลนครพิงค์ (ต่อ)

	ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง	จำนวน (n=138)	%
Pharmacy	Folic acid	73	9.26
	Ferrous fumarate	51	6.47
	Furosemide	34	4.32
	Omeprazole	33	4.19
	Vitamin B	32	4.06
	Other	565	71.70

จากตารางที่ 1 พบว่า กลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ เป็นเพศหญิง จำนวน 84 ราย (ร้อยละ 60.9) รองลงมา เป็นเพศชาย จำนวน 54 ราย (ร้อยละ 39.1) อายุเฉลี่ยส่วนใหญ่ 61-81 ปี จำนวน 54 ราย (ร้อยละ 39.13) รองลงมา 41-60 ปี จำนวน 47 ราย (ร้อยละ 34.06) การวินิจฉัยเป็นโรค พบ Chronic Kidney Disorder มากที่สุด จำนวน 30 ราย (ร้อยละ 21.74) รองลงมา คือ Hypertension จำนวน 9 ราย (ร้อยละ 6.52) และยาที่ได้รับจะเป็น Folic acid มากที่สุด จำนวน 73 ราย (ร้อยละ

9.26) รองลงมา คือ Ferrous fumarate จำนวน 51 ราย (ร้อยละ 6.47) นอกจากนี้ จากการวินิจฉัยโรค ยังพบว่า กลุ่มตัวอย่างยังมีโรค/อาการ อื่นๆ ร่วมด้วย ถึง 77 ราย (ร้อยละ 55.80) และได้รับยาอื่นๆ 565 ชนิด (ร้อยละ 71.70)

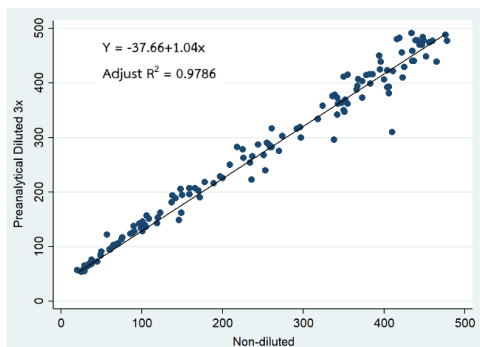
ส่วนที่ 2 ผลการทดสอบความสัมพันธ์ของระดับเฟอร์ริตินในกลุ่มที่ไม่เจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ เทียบกับกลุ่มที่เจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ ดังนี้



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ของระดับเฟอร์ริตินในกลุ่มไม่เจาะจางตัวอย่างเทียบกับกลุ่มที่เจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า

จากรูปที่ 1 การทดสอบความสัมพันธ์ของระดับเฟอร์ริตินในกลุ่มที่ไม่เจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ เทียบกับกลุ่มที่เจาะจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า ด้วยสถิติ Spearman's correlation และ Simple linear regression พบว่า กลุ่มที่ 1

การไม่เจาะจางตัวอย่างกับการเจาะจางตัวอย่าง 2 เท่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง มีค่าความสัมพันธ์ $r=0.994$ ($p<0.01$) ส่วนผลการทดสอบการเจาะจางตัวอย่าง 3 เท่า และ 4 เท่า จะมีความแตกต่างกัน ดังรูปที่ 2 และ 3 ต่อไปนี้



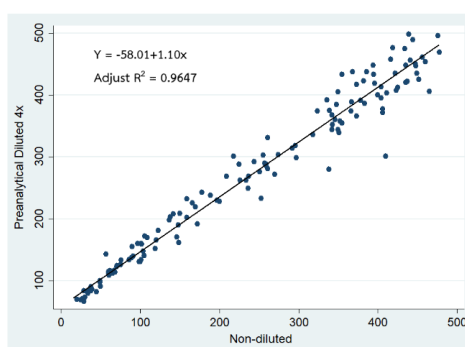
รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของระดับเฟอร์ริตินในกลุ่มที่ไม่เจือจางตัวอย่างเทียบกับกลุ่มที่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 3 เท่า

จากรูปที่ 2 และ 3 การไม่เจือจางตัวอย่างกับเจือจางตัวอย่าง 3 เท่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง มีค่าความสัมพันธ์ $r=0.989$ ($p<0.01$) และจากรูปที่ 3 การไม่เจือจางตัวอย่างกับการเจือจางตัวอย่าง 4 เท่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง มีค่าความสัมพันธ์ $r=0.977$ ($p<0.01$) และพบว่าการไม่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์กับการเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

ตารางที่ 2 ความแตกต่างของระดับเฟอร์ริตินในกลุ่มที่ไม่เจือจางตัวอย่างและกลุ่มที่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า 3 เท่า และ 4 เท่า

Group	mean $\pm$ SD	Mean difference (95%CI)	P value
Non-diluted sample	240.62 $\pm$ 146.69	Reference	
Preanalytical Diluted 2 times	265.36 $\pm$ 151.99	-24.74 (-21.89, -27.59)	<0.01
Preanalytical Diluted 3 times	267.90 $\pm$ 151.99	-27.28 (-23.57, -30.98)	<0.01
Preanalytical Diluted 4 times	271.54 $\pm$ 131.02	-30.9 (-25.79, -36.03)	<0.01

จากตารางที่ 2 ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับเฟอร์ริตินในกลุ่มที่ไม่เจือจางตัวอย่างกับกลุ่มที่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ พบว่า การเจือจางในระดับ 2 เท่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของระดับเฟอร์ริตินในกลุ่มที่ไม่เจือจางตัวอย่างเทียบกับกลุ่มที่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 4 เท่า

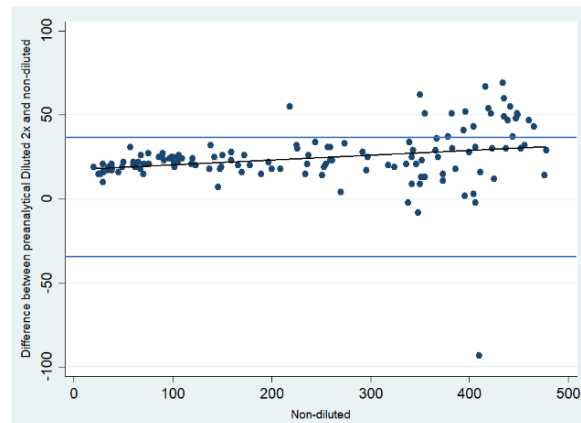
ค่าความสัมพันธ์สูงสุด และที่ระดับเฟอร์ริตินสูงขึ้นค่าความสัมพันธ์จะลดลง

เมื่อทดสอบความแตกต่างของระดับเฟอร์ริตินทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อทดสอบด้วย Paired-T test พบความแตกต่างค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) โดยที่กลุ่มเจือจางตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ 2 เท่า มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด (mean difference -24.74%) ดังตารางต่อไปนี้

ค่าความแตกต่างค่าเฉลี่ย mean difference -24.74 ,การเจือจางในระดับ 3 เท่า mean difference -27.28 และการเจือจางในระดับ 4 เท่า mean difference -30.90 และเมื่อ

ความสอดคล้องของระดับเฟอร์รีตินในเลือดระหว่างการไม่เจือจางตัวอย่าง และการเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

เลือกนำผลการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างที่เจือจาง 2 เท่า มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่าง จะพบมีความแตกต่าง ดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 4 ความแตกต่างระดับเฟอร์รีตินระหว่างกลุ่มที่ไม่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์กับกลุ่มเจือจางก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า

จากรูปที่ 4 ความแตกต่างระดับเฟอร์รีตินระหว่างกลุ่มที่ไม่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์กับกลุ่มเจือจาง 2 เท่า พบว่า ความแตกต่างคงที่ในช่วงระดับเฟอร์รีตินต่ำ และในช่วงค่าระดับเฟอร์รีตินสูงขึ้นจะเริ่มมีความแตกต่างมากขึ้น โดยมีความแตกต่างเป็นไปในทิศทางบวกมากขึ้นตามลักษณะเส้นกราฟ และเมื่อทำการ

ทดสอบด้วยสถิติแคปปา(Kappa) พบกลุ่มที่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า มีการแปลผลสอดคล้องกับกลุ่มไม่เจือจางตัวอย่าง โดยมีขนาดความสอดคล้องในระดับดีมาก^[11] (Kappa=0.898) และมีความสอดคล้องของการแปลผลระหว่างกลุ่มดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3 ความสอดคล้องของการแปลผลระหว่างกลุ่มไม่เจือจางกับกลุ่มเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า 3 เท่า และ 4 เท่า

Sample type	Non-diluted group		
	Abnormal	Normal	Total
Preanalytical Diluted 2 times			
Abnormal	70	0	70
Normal	7	61	68
Total	77	61	138
Preanalytical Diluted 3 times			
Abnormal	70	7	77
Normal	0	61	61
Total	70	68	138

ตารางที่ 3 ความสอดคล้องของการแปลผลระหว่างกลุ่มไม่เจือจางกับกลุ่มเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า 3 เท่า และ 4 เท่า (ต่อ)

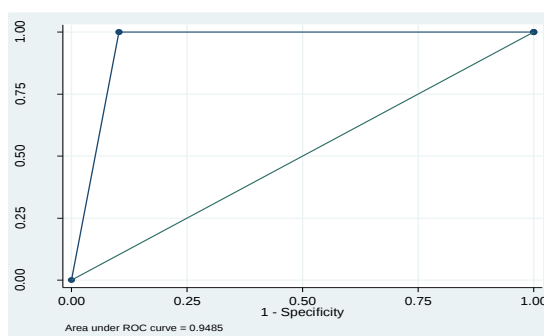
Sample type	Non-diluted group		
	Abnormal	Normal	Total
Preanalytical Diluted 4 times			
Abnormal	70	11	81
Normal	0	57	57
Total	70	68	138

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ในตัวอย่างกลุ่มไม่เจือจางกับกลุ่มเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า 3 เท่า และ 4 เท่า

Sample type	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
Preanalytical Diluted 2 times	90.90	100	100	89.70
Preanalytical Diluted 3 times	100	89.71	90.91	100
Preanalytical Diluted 4 times	100	83.82	86.42	100

จากตารางที่ 3 พบว่า กลุ่มเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า มีความไว (Sensitivity) 90.90%, มีความจำเพาะ (Specificity) 100.00%, ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value, PPV) 100% และค่าทำนายผลลบ (negative predictive

value, NPV) 89.7% ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ในการยืนยันค่าที่ปกติ/ผิดปกติ รวมทั้งการยืนยันการวินิจฉัยโรค ซึ่งหากทำการประเมินความถูกต้องของวิธีการวินิจฉัยโรค ภายใต้การพิจารณาจุดตัดที่เหมาะสมด้วยกราฟเส้นโค้ง ROC ผลการประเมิน ดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 5 พื้นที่ใต้โค้งของกราฟ AUC ของกลุ่มไม่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์เทียบกับกลุ่มเจือจางตัวอย่าง 2 เท่า

จากรูปที่ 5 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์โดยกราฟ ROC จะแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ของทั้งสองแกน โดยมีจุดตัด (Cut-off point) จะอยู่ใกล้จุดตำแหน่ง (0,1) มากที่สุด โดยจุดตัด

normal เป็นช่วงค่าอ้างอิงปกติของทั้งเพศชายและเพศหญิง (เพศชาย=30-300 ng/ml, เพศหญิง =15-160 ng/ml) และ จุด ตัด abnormal เป็นค่าที่อยู่นอกช่วงค่าอ้างอิงปกติ จากกราฟ ROC แสดงค่าความไวและ

ความจำเพาะสูง จากพื้นที่ใต้โค้งของกราฟมีค่า AUC= 94.90% (ระดับดีมาก)^[12] และช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับ 95%CI (0.912 - 0.985)

สรุปและอภิปรายผล

ผลการทดสอบความสอดคล้องที่มีองค์ประกอบของความสัมพันธ์ของระดับเฟอร์ริติน ในกลุ่มที่ไม่เจ็บป่วยเทียบกับกลุ่มที่เจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ ที่ระดับ 2 เท่า, 3 เท่า และ 4 เท่า พบว่าการเจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า มีค่าความสัมพันธ์สูงสุด และในช่วงค่าระดับเฟอร์ริตินสูงขึ้นจะเริ่มมีความแตกต่างมากขึ้นเมื่อทำการทดสอบด้วยสถิติ Kappa พบกลุ่มที่เจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า มีการแปลผลสอดคล้องกับกลุ่มไม่เจ็บป่วยตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีขนาดความสอดคล้องในระดับดีมาก เมื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์โดยกราฟ ROC พบกลุ่มเจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ 2 เท่า มีความไว ความจำเพาะสูง สามารถใช้ประโยชน์ในการยืนยันค่าปกติ/ผิดปกติ สามารถแปลผลการวิเคราะห์ได้ถูกต้อง ซึ่งสอดคล้องกับศึกษาของ Wu SJ.^[13] ที่พบว่า การเจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริติน 5 เท่า (ด้วยหลักการ Sandwich immunoassay ซึ่งแตกต่างจากหลักการที่ใช้ในการศึกษานี้) สามารถลดจำนวนการทำซ้ำ โดยการเจ็บป่วยตัวอย่างจาก 37 ใน 1,026 ตัวอย่าง เหลือเป็น 4 ตัวอย่างจาก 1,033 ตัวอย่าง สามารถลดระยะเวลารอคอยได้จาก 64 นาที เป็น 55 นาที นอกจากนี้ Lotfi S.Bin Dahman^[14] ได้ศึกษาระดับการเจ็บป่วยตัวอย่าง สามารถนำไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพความแตกต่างของเครื่องมือและเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยความไว และความจำเพาะ รวมทั้งการมีจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นจะช่วยให้เกิดความ

ถูกต้องที่ตีความและมีความเที่ยงตรงมากขึ้น ซึ่งสามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้หรือขยายผลทางทางปฏิบัติได้มากยิ่งขึ้น^[15]

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริติน 2 เท่า มีความแตกต่างจากกลุ่มไม่เจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ (mean difference -24.74, Z=-9.877, P<0.01) แต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าความผิดพลาดทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ (Total allowable error) 16.9% ของการทดสอบเฟอร์ริตินที่กำหนดโดย CLIA ในปี 2019^[10]

ดังนั้น การนำวิธีเจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ระดับเฟอร์ริตินในเลือด 2 เท่า มาใช้ในห้องปฏิบัติการ สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้สอดคล้อง กับกลุ่มไม่เจ็บป่วยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์และสามารถวินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง ในระดับดีมาก สามารถเพิ่มความสามารถในการวิเคราะห์เป็น 1,000 ng/ml. และสามารถลดการทำซ้ำได้ 744 ราย ทั้งหมด 4,012 ราย (ร้อยละ18.5) การเจ็บป่วยตัวอย่าง 3 เท่าและ 4 เท่าสามารถเพิ่มความสามารถการวิเคราะห์ได้ 1,500 ng/ml. และ 2,000 ng/ml. ลำดับ แต่จะมีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยกับกลุ่มไม่เจ็บป่วยมากขึ้นตามลำดับด้วย การนำมาใช้จึงควรประเมินความแตกต่างผลการวิเคราะห์ร่วมกับแพทย์ผู้รักษาด้วย

ข้อเสนอแนะในการใช้ประโยชน์จากการวิจัย

- 1) สามารถใช้ประโยชน์กำหนดวิธีปฏิบัติ (Work instruction) ใช้ในการปฏิบัติงาน
- 2) ควรใช้การวินิจฉัยของแพทย์รวมทั้งประวัติการรักษา จำแนกกลุ่มตัวอย่างที่มีภาวะธาตุเหล็กเกิน และภาวะขาด

เหล็ก ก่อนเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์จะสามารถช่วยลดจำนวนการวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งได้

3) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับลักษณะตัวอย่าง หรือปัจจัย ในกลุ่มผู้ป่วยที่ผลการวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกับกลุ่มที่ไม่เจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ (จำนวน 7 รายจาก 138 ราย)

4) ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบและยืนยันความถูกต้องผลวิเคราะห์จากเครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์อื่นๆ จะทำให้สามารถนำการเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ มาใช้เป็นวิธีการปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. Public Health Nutr. 2009;12(4):444-54. doi: 10.1017/S1368980008002401.
2. Department of Mental Health. Iron Deficiency Anemia Resulting in decreasing 5-10 points of IQ in Scholl age [Internet]; c2019. Available from: <https://www.dmh.go.th/news-dmh/view.asp?id=29701>.
3. Nakorn SN. Iron Deficiency Anemia. J Hematol Transf Med. 1991;1(1):77-104.
4. Kidchalard J, Tayapiwatana C. Detection of Serum Ferritin by Indirect Sandwich ELISA. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci. 2003;36(2):91-9.
5. WHO GUIDELINE DEVELOPMENT GROUP. WHO guideline on use of ferritin concentrations to assess iron status in individuals and populations. Geneva: World Health Organization; 2020.
6. Goodhand JR, Kamperidis N, Rao A, Laskaratos F, McDermott A, Wahed M, et al. Prevalence and management of anemia in children, adolescents, and adults with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(3):513-9. doi: 10.1002/ibd.21740.
7. Short MW, Domagalski JE. Iron deficiency anemia: evaluation and management. Am Fam Physician. 2013;87(2):98-104.
8. Viprasit V. Comprehensive Management for Thalassemia. Hematol Transfus Med. 2013;23(4):303-20. Available from: [http://www.tsh.or.th/file_upload/files/09\(4\).pdf](http://www.tsh.or.th/file_upload/files/09(4).pdf)
9. Abbott Laboratories. Quantia ferritin package insert. Abbott: Wiesbaden Germany; 2017.
10. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, et. al. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation [Internet]; c2014. Available from: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

11. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.
12. Ray P, Manach YL, Riou B, Houle TT. Statistical Evaluation of a Biomarker. *Anesthesiology*. 2010; 112(4):1023-40. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181d47604.
13. Wu SJ, Hayden JA. Upfront dilution of ferritin samples to reduce hook effect, improve turnaround time and reduce costs. *Biochem Med (Zagreb)*. 2018;28(1):010903. doi: 10.11613/BM.2018.010903.
14. Dahman LSB, Sumaily KM, Sabi EM, Hassan MA, Thalab AMB, Sayad AS, et al. A Comparative Study for Measuring Serum Ferritin Levels with Three Different Laboratory Methods: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Cobas e411 and Cobas Integra 400 Methods. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(2):320. doi: 10.3390/diagnostics12020320.
15. Sarakarn P, Mulpolsri P. OPTIMAL CUT-OFF POINTS FOR RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC (ROC) CURVE ANALYSIS IN DEVELOPING TOOLS OF HEALTH INNOVATIONS: EXAMPLE USING STATA. *Thai Bull Pharm Sci*. 2021;16(1):93-108