

การประเมินคุณภาพชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับโคตินินในปัสสาวะ

Assessment of Rapid Urine Cotinine Test Kit

พิศิษฐ์ นามจันทร์^{1*} รสสุคนธ์ ชนธีระบรรจง² และ กาญจนา สุริยะพรหม¹

¹คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

²สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี ตำบลประชาธิปัตย์ อำเภอรัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12130

E-mail: pisit.n@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

การประเมินคุณภาพชุดทดสอบสำเร็จรูปโคตินินในปัสสาวะ โดยทำการตรวจวัดโคตินินในปัสสาวะของผู้สูบบุหรี่ 200 คน และผู้ไม่สูบบุหรี่ 200 คน โดยใช้ชุดทดสอบ EZ-sign Smoke เปรียบเทียบกับการตรวจโดยวิธี Gas chromatography/Mass spectrometry (GC/MS) ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่จำนวน 200 คน ให้ผลบวกโดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke จำนวน 200 คน ให้ผลบวกโดยวิธี GC/MS จำนวน 192 คน กลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 200 คน ทุกคนให้ผลลบทั้งการตรวจโดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke และวิธี GC/MS การประเมินความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องของชุดทดสอบ EZ-sign Smoke พบว่ามีค่าเท่ากับ 96%, 100% และ 98% ตามลำดับ การวิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่างชุดทดสอบ EZ-sign Smoke กับวิธี GC/MS พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ Kappa เท่ากับ 0.96 ($p < 0.01$)

คำสำคัญ: โคตินิน ปัสสาวะ ชุดทดสอบ

Abstract

The “EZ-sign Smoke” rapid urine cotinine test kit was evaluated. Urine from 200 smokers and 200 non-smokers were analyzed using “EZ-sign Smoke” test kit and Gas chromatography/Mass spectrometry (GC/MS) method. Two-hundred smokers were positive with “EZ-sign Smoke” while 192 smokers were positive with GC/MS. All non-smokers were negative with both “EZ-sign Smoke” and GC/MS. The sensitivity, specificity, and accuracy of EZ-sign Smoke were 96%, 100%, and 98%, respectively. The concordance between “EZ-sign Smoke” and GC/MS was analyzed using Kappa test and the Kappa coefficient was 0.96 ($p < 0.01$).

Keywords: Cotinine, urine, rapid test kit

1. บทนำ

การสูบบุหรี่เป็นสาเหตุการตายที่สำคัญโดยองค์การอนามัยโลก รายงานว่ามีผู้เสียชีวิตจากโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ปีละ 5 ล้านคน (WHO, 2009) ในประเทศไทยมีการสำรวจจำนวนผู้สูบบุหรี่โดยปี พ.ศ. 2552 ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อควบคุมยาสูบ (ศยว.) รายงานจำนวนผู้สูบบุหรี่ในคนไทยอายุเกิน 15 ปี มีจำนวน 10.9 ล้านคน (ศยว., 2552) หรือมีอัตราการสูบบุหรี่ร้อยละ 20.70 ผู้สูบบุหรี่เหล่านี้มีโอกาสเสียชีวิตก่อนวัยอันสมควร เนื่องจากในควันบุหรี่มีสารพิษหลายชนิดได้แก่ นิโคติน อะโครลีน คาร์บอนมอนอกไซด์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ สารกลุ่ม Polycyclic Aromatic Amines (PAH) แอมโมเนีย โลหะหนัก และสารกัมมันตรังสี ได้แก่ โปโลเนียม เป็นต้น (สุทัศน์ รุ่งเรืองหิรัญญา, 2552) สารพิษเหล่านี้ทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคมะเร็งปอด โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง โรคในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ ถุงลมโป่งพอง ภูมิแพ้ หลอดลมอักเสบ

โคตินิน (Cotinine) เป็นสารเมตาบอไลต์ของนิโคติน ภายหลังการสูบบุหรี่ควันบุหรี่จะผ่านทางเดินหายใจเข้าสู่ปอด เมื่อควันบุหรี่เข้าสู่ถุงลมของปอด นิโคตินจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็ว เนื่องจากบริเวณถุงลมของปอดมีของเหลว (Body Fluid) ที่มี pH 7.4 และนิโคตินละลายได้ดีในของเหลวดังกล่าว ทำให้มีการดูดซึมผ่านผนังเซลล์ได้ดี เมื่อมีการสูบบุหรี่นิโคตินจะเข้าสู่สมองภายใน 10-20 วินาที ภายหลังการสูบบุหรี่หมดมวน ผู้สูบจะได้รับนิโคตินประมาณ 1-1.5 มิลลิกรัม (Benowitz et al., 2009) นิโคตินที่ถูกดูดซึมผ่านปอดจะเข้าสู่กระแสโลหิตและมีการกระจายตัวสู่เนื้อเยื่อต่างๆ นิโคตินมีครึ่งชีวิต (half-life) ประมาณ 2 ชั่วโมง โดยนิโคตินจะถูกกำจัดที่ตับโดยเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6

(CYP2A6) ได้ 5'-Hydroxy- nicotine และ nicotine- $\Delta^{1'(5)}$ -Iminium ion จากนั้นจะถูก Aldehyde Oxidase เปลี่ยนให้เป็น Cotinine ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นเมตาบอไลต์อีกหลายชนิด ได้แก่ 3'-Hydroxycotinine, Trans-3'-Hydroxy-Cotinine, Cotinine Glucuronide และถูกขับออกในปัสสาวะ โคตินินมีครึ่งชีวิต (half-life) ประมาณ 16 ชั่วโมง การตรวจโคตินินในปัสสาวะใช้ยืนยันการได้รับนิโคติน เนื่องจากเป็นสารเมตาบอไลต์ของนิโคตินดังกล่าวแล้วข้างต้น โดยภายหลังการสูบบุหรี่จะตรวจพบโคตินินในปัสสาวะ เป็นระยะเวลาประมาณ 3-4 วัน (Benowitz et al., 2009)

การตรวจโคตินินในปัสสาวะมีวิธีตรวจหลายวิธี การตรวจโดยชุดทดสอบสำเร็จรูป (Rapid Test) เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก มีหลักการการทดสอบคือ ชุดทดสอบมีการยิดโคตินินไว้ที่บริเวณทดสอบ (Test Line) เมื่อโคตินินในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อโคตินินที่ติดฉลากด้วย Colloidal Gold เคลื่อนที่ไปที่บริเวณทดสอบ จะไม่เกิดแถบสี ในทางกลับกันหากในตัวอย่างไม่มีโคตินิน แอนติบอดีต่อโคตินินที่ติดฉลากด้วย Colloidal Gold ในรูปอิสระเคลื่อนที่ไปทำปฏิกิริยากับโคตินินที่บริเวณทดสอบทำให้เกิดแถบสี อ่านผลเป็นลบ (Negative) การทดสอบโดยชุดทดสอบที่เป็น Rapid Test เป็นการทดสอบในลักษณะ Semi-Quantitative จะให้ผลบวกเมื่อมีโคตินินในตัวอย่างตั้งแต่ 200 ng/mL ขึ้นไป นอกจากการตรวจโดยชุดทดสอบสำเร็จรูปแล้ว ยังสามารถตรวจโดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Radioimmunoassay (RIA), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และวิธี Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS) วิธี GC/MS เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจวัดโคตินินที่ระดับความเข้มข้น 0.1-0.2 ng/mL (Jacob et al., 1991)

ปัจจุบันในประเทศไทยมีการณรงค์การลดละ เลิกบุหรี่กันอย่างกว้างขวาง โดยเครือข่ายวิชาชีพแพทย์ในการควบคุมการบริโภคยาสูบ ร่วมกับเครือข่ายวิชาชีพสุขภาพเพื่อสังคมไทยปลอดบุหรี่ได้จัดให้มี “คลินิกฟ้าใส” ซึ่งเป็นคลินิกที่ให้บริการช่วยเหลือเลิกบุหรี่แก่ผู้สูบบุหรี่ที่ต้องการเลิกบุหรี่ (เครือข่ายวิชาชีพแพทย์ในการควบคุมการบริโภคยาสูบ, 2556) นอกจากนี้ในโรงพยาบาลต่างๆ มีการให้บริการการเลิกบุหรี่ ดังนั้นจึงต้องการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยการติดบุหรี่ และตรวจติดตามการเลิกบุหรี่ การตรวจโคตินินยังมีการใช้อยู่ในวงจำกัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงประสงค์จะประเมินคุณภาพของชุดทดสอบสำเร็จรูป “EZ-sign Smoke” เปรียบเทียบกับวิธี GC/MS หากชุดทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพจะสามารถใช้ชุดทดสอบดังกล่าวในการวินิจฉัยการติดบุหรี่และติดตามการเลิกบุหรี่ต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินคุณภาพของชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับโคตินินในปัสสาวะ “EZ-sign Smoke” โดยการเปรียบเทียบกับวิธี Gas chromatography/Mass spectrometry (GC-MS)

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 กลุ่มตัวอย่าง เป็นอาสาสมัครที่มาใช้บริการกลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันบำบัตร์รักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี โดยเป็นผู้สูบบุหรี่จำนวน 200 คน และผู้ไม่สูบบุหรี่จำนวน 200 คน

3.2 เครื่องมือเครื่องที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ Gas Chromatography รุ่น HP 5890 Series II and Series II Plus ยี่ห้อ Hewlett Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่อง Mass Spectrometer รุ่น HP 5972 A and HP

6890 Series Mass Selective Detectors ยี่ห้อ Hewlett Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 ชุดทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้คือ EZ-sign Smoke ของบริษัท DINONA ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

3.4 วิธีการทดสอบ อาสาสมัครปัสสาวะใส่ในกระบอกเก็บปัสสาวะแล้วนำส่งให้เจ้าหน้าที่พร้อมแบบสอบถามและใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย นำปัสสาวะที่ได้ตรวจโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป EZ-sign Smoke และอ่านผลการตรวจภายใน 5-8 นาที จากนั้นนำปัสสาวะมาตรวจยืนยันโดยวิธี GC/MS

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล โดยการคำนวณ ค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) และค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของชุดทดสอบสำเร็จรูป EZ-sign Smoke คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ Kappa

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการวิจัยและพิจารณาจริยธรรมการวิจัย สถาบันธัญญารักษ์ (ปัจจุบันคือ สถาบันบำบัดรักษาและฟื้นฟูผู้ติดยาเสพติดแห่งชาติบรมราชชนนี)

4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

ผลการตรวจโคตินินในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่ จำนวน 200 คน ให้ผลบวก (Positive) โดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke จำนวน 200 คน ให้ผลบวกโดยวิธี GC/MS จำนวน 192 คน ให้ผลลบ (Negative) โดยวิธี GC/MS จำนวน 8 คน

ผลการตรวจโคตินินในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 200 คน ให้ผลลบโดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke จำนวน 200 คน ให้ผลลบโดยวิธี GC/MS จำนวน 200 คน

การเปรียบเทียบผลการตรวจ Cotinine โดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke และวิธี GC/MS แสดงในตารางที่ 1 เมื่อคำนวณความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง ของชุดทดสอบ EZ-sign Smoke พบว่าความไว เท่ากับ 96% ความจำเพาะ เท่ากับ 100% ความถูกต้อง เท่ากับ 98% เมื่อพิจารณาถึงความสอดคล้องของ 2 วิธี โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ Kappa พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.96 ($p < 0.01$)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการตรวจ Cotinine โดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke กับวิธี GC/MS

EZ-sign Smoke	GC/MS	
	POSITIVE	NEGATIVE
POSITIVE	192	8
NEGATIVE	0	200

5. การอภิปรายผล

ผลการตรวจโคตินินในปัสสาวะโดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 96.0% และ 100% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจโดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke กับวิธี GC/MS พบว่ามีผลการตรวจที่สอดคล้องกันร้อยละ 98.0 โดยการตรวจโดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke ให้ผลบวกหลวง (False Positive) ร้อยละ 3.8 (8/200) รายที่ผลการตรวจโดยชุดทดสอบ EZ-sign Smoke ให้ผลบวกแต่ GC/MS ให้ผลเป็นลบ อาจเกิดจากการที่มีสารในปัสสาวะที่ทำปฏิกิริยา cross reaction กับ Anti-Cotinine ที่ใช้ในปฏิกิริยา Immunoassay งานวิจัยของ Zuccaro et.al. (1997) ทำการตรวจโคตินินในปัสสาวะโดยวิธี Radioimmunoassay พบว่า Trans-3'-Hydroxycotinine ทำปฏิกิริยา cross reaction กับ anti-cotinine งานวิจัยของ Heinrich-Ramm และคณะ (2002) พบว่า nicotine metabolites ตัวอื่นๆ เช่น trans-3'-Hydroxycotinine

ทำปฏิกิริยา Cross Reaction ในปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินิน (Heinrich-Ramm et al., 2002) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Schepers ที่รายงานการเกิด Cross Reaction ของ Nicotine Metabolites ในปฏิกิริยา Immunoassay (Schepers et al., 1998) ในงานวิจัยนี้ผู้สอบหรีจำนวน 8 รายให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป แต่ให้ผลลบเมื่อตรวจด้วยวิธี GC/MS อาจเกิดจากการที่มี Metabolite ชนิดอื่นของ Nicotine ที่อาจทำปฏิกิริยาได้กับ Anti-Cotinine หรืออาจเกิดจากมีสารชนิดอื่นที่มีผลรบกวนการตรวจวัด

6. บทสรุป

การตรวจโคตินินในปัสสาวะโดยชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับโคตินินในปัสสาวะยี่ห้อ EZ-sign Smoke พบว่ามีความไว 96.0% ความจำเพาะ 100% ความถูกต้อง 98.0% ผลการตรวจมีความสอดคล้องกับวิธี GC/MS โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ Kappa เท่ากับ 0.96 ($p < 0.01$) มีคุณภาพเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวินิจฉัยการติดบุหรี่และการติดตามการเลิกบุหรี่ นอกจากนี้การตรวจโดยชุดทดสอบสำเร็จรูปทำได้ง่าย สะดวก และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ รวมทั้งไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจ

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

8. เอกสารอ้างอิง

- ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อควบคุมยาสูบ (ศกย.). (2552). สถานการณ์การควบคุมการบริโภคยาสูบของประเทศไทย พ.ศ.2552
- Benowitz, N.L., Hukkanen, J., and Jacob, P. 3rd. (2009). Nicotine Chemistry, Metabolism,

Kinetics and Biomarkers. Handb Exp

Pharmacol. 192: 29–60.

Heinrich-Ramm, R., Wegner, R., Garde, A.H.,
and Baur, X. (2002). Cotinine excretion
(tobacco smoke biomarker) of smokers
and non-smokers: comparison of GC/MS
and RIA results. International Journal of
Hygiene and Environmental Health.
205(6): 493-499.

Schepers, G., and Walk, R.A. (1998). Cotinine
determination by immunoassays may be
influenced by other nicotine metabolites.
Arch Toxicol. 62(5):395-397.

World Health Organization (WHO). (2009).

WHO report on the global tobacco
epidemic, 2009. Implementing smoke-
free environments.

Zuccaro, P., Pichini, S., Altieri, I., Rosa, M.,
Pellegrini, M., and Pacifici, R. (1997).
Interference of Nicotine Metabolites in
Cotinine Determination by RIA.
Clin Chem. 43(1): 180-181.