

บทที่ 6

ผลการวิจัย

จำนวนชิ้นเนื้อในกลุ่มมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิจำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ชิ้นเนื้อในกลุ่มมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาจากที่อื่นมีจำนวน 24 ตัวอย่าง ชิ้นเนื้อทั้งสองกลุ่มถูกนำมาทำการค้นหาภาวะ LOH โดยใช้ markers ทั้งหมด 9 STRPs loci ที่กระจายอยู่บนตำแหน่งต่างๆกันของโครโมโซมทั้ง 5 คู่ที่เลือกมาทำการศึกษา

1. อุบัติการณ์ของภาวะ LOH บนโครโมโซมที่ทำการศึกษาในมะเร็งทั้งสองกลุ่ม แยกรายงานตาม loci

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ในมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาแยกตามตำแหน่ง loci ที่ใช้ในการศึกษา

ตำแหน่ง	โครโมโซม	loci	ชนิดของมะเร็ง	ผลของการตรวจวิเคราะห์				
				Retain heterozygote	LOH positive	Uninformative	MSI (I)	Failed
1p	AMY-2B		มะเร็งตับปฐมภูมิ(25)	8	5	10	1	1
			มะเร็งตับดีโน(24)	12	0	11	1	0
1q	AGT		มะเร็งตับปฐมภูมิ	12	4	8	0	1
			มะเร็งตับดีโน	17	2	4	1	0
4q	D4S192		มะเร็งตับปฐมภูมิ	13	2	9	1	0
			มะเร็งตับดีโน	9	0	14	1	0
4q	D4S194		มะเร็งตับปฐมภูมิ	10	3	7	4	1
			มะเร็งตับดีโน	9	0	13	0	2
8q	D8S88		มะเร็งตับปฐมภูมิ	15	2	5	1	2
			มะเร็งตับดีโน	19	1	3	1	0
16q	D16S514		มะเร็งตับปฐมภูมิ	9	3	6	0	7
			มะเร็งตับดีโน	9	3	4	0	8
18q	D18S55		มะเร็งตับปฐมภูมิ	12	2	4	2	5
			มะเร็งตับดีโน	6	5	8	4	1
18q	D18S70		มะเร็งตับปฐมภูมิ	11	1	4	2	7
			มะเร็งตับดีโน	12	4	6	1	1
18q	D18S57		มะเร็งตับปฐมภูมิ	7	4	8	3	3
			มะเร็งตับดีโน	11	2	10	0	1

ตารางที่ 7 แสดงผลการศึกษา LOH ในมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิในแต่ละ loci บนโครโมโซมทุกคู่ที่เลือกมาศึกษา

Chromo some	Arm	Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	34	35	no of LOH/INF
1	p	AMY-2B	I	○	U	U	●	○	U	○	U	●	●	○	●	○	○	U	●		U	U	U	U	○	○	U	38.5
	q	AGT	○	U	○	U	U	○	U	●	U	U	○	○	●	U	○	●	○	●	○	U	○		○	○	○	25
4	q	4S192	○	○	U	○	●	U	U	○	○	U	○	○	U	I	○	○	●	U	○	U	U	U	○	○	○	13.3
	q	4S194	I	○	U	I	○	○	●	U	●	U	○	○	○	U	U	U	I	U	●	I	○	○	○		○	23.1
8	q	8S88	I	○	○	○	●	○	○	○	○	U	U	○	○	●		U		U	○	○	○	U	○	○	○	11.8
16	q	16S514	U	○	○	U	○	○	U	U	●	U	●		U		○					○	○		○	○	●	25
18	q	18S70	○	U	○			○	I	○	U	○	●	○	○		○		U		I			U	○	○	○	8.3
	q	18S55	○		○		○	○	○	I	U	○	U		I	○	○	●	●			○	○	○	U	U	○	14.3
	q	18S57	I	U	○	○	○	○	●	●	I	U	●	U	○		U	U	U		U	I	U	●		○	○	36.4

หมายเหตุ ● หมายถึงชิ้นเนื้อที่มีภาวะ LOH ○ หมายถึงชิ้นเนื้อที่ตรวจไม่พบภาวะ LOH U หมายถึง uninformative case I หมายถึงชิ้นเนื้อที่ตรวจพบเป็น MSI

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษา LOH ในมะเร็งตับที่แพร่กระจายมาในแต่ละ loci บนโครโมโซมทุกคู่ที่เลือกมาศึกษา

Chromosome	Arm	Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	no of LOH/INF
1	p	AMY-2B	○	U	I	○	○	U	○	U	U	○	U	○	U	○	○	U	○	U	○	U	○	○	U	U	0
	q	AGT	○	○	●	○	○	○	○	○	○	U	U	○	○	○	○	U	○	○	I	●	U	○	○	○	10.5
4	q	4S192	○	U	U	U	U	U	○	U	U	U	○	U	○	U	U	U	○	○	I	○	○	U	U	○	0
	q	4S194	○	○	U	○	U	U	○	U	U	U	○	U	○	U	U	U	○			U	U	U	○	○	0
8	q	8S88	U	○	○	○	○	○	○	○	○	○	U	○	○	○	U	●	○	○	I	○	○	○	○	○	5
16	q	16S514	○	○				●	●	U	○				○	U	U	●	○			○	U	○	○	○	25
18	q	18S70	○	U	U	○	●	○	○	○	U	I	U	○	○	U	○		○	U	●	●	○	●	○	○	25
	q	18S55	U	●		U	I	I	●	U	U	●	○	U	U	U	I	○	U	○	I	●	○	●	○	○	45.5
	q	18S57	U	●	U	U	○	○	U	U	U	○	U	U	○	U	○	○	U	○		○	○	●	○	○	15.4

หมายเหตุ ● หมายถึงชิ้นเนื้อที่มีภาวะ LOH ○ หมายถึงชิ้นเนื้อที่ตรวจไม่พบภาวะ LOH U หมายถึง uninformative case I หมายถึงชิ้นเนื้อที่ตรวจพบเป็น MSI

ตารางที่ 9 แสดงผลการศึกษาภาวะ LOH ในมะเร็งตับปฐมภูมิแยกตามโครโมโซมที่ทำการศึกษา

Chromosome	Arm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	34	35	no of LOH/INF	
1	p	I	○	U	U	●	○	U	○	U	●	●	○	●	○	○	U	●		U	U	U	U	○	○	U	38.5	
1	q	○	U	○	U	U	○	U	●	U	U	○	○	●	U	○	●	○	●	○	U	○		○	○	○	25	
4	q	○	○	U	○	●	○	●	○	●	U	○	○	○	I	○	○	●	U	●	U	○	○	○	○	○	25	
8	q	I	○	○	○	●	○	○	○	○	U	U	○	○	●		U		U	○	○	○	U	○	○	○	11.8	
16	q	U	○	○	U	○	○	U	U	●	U	●		U		○						○	○		○	○	●	25
18	q total	○	U	○	○	○	○	●	●	U	○	●	○	○	○	○	●	●		I	○	○	●	○	○	○	28.5	
18	q gr I	○	U	○		○	○	○	○	U	○	●	○	○	○	○	●	●		I	○	○	○	○	○	○	15	
18	q gr II	I	U	○	○	○	○	●	●	I	U	●	U	○		U	U	U		U	I	U	●		○	○	36.4	

หมายเหตุ ○ คือ retain heterozygote      ● คือ LOH positive      U คือ uninformative case  
 I คือ microsatellite instability      gr I คือ D18S55 + D18S70      gr II คือ D18S57

ตารางที่ 10 แสดงผลการศึกษากภาวะ LOH ในมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาแยกตามโครโมโซมที่ทำการศึกษา

Chromosome	Arm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	no of LOH/INF
1	p	○	U	I	○	○	U	○	U	U	○	U	○	U	○	○	U	○	U	○	U	○	○	U	U	0
1	q	○	○	●	○	○	○	○	○	○	U	U	○	○	○	○	U	○	○	I	●	U	○	○	○	10.5
4	q	○	○	U	○	U	U	○	U	U	U	○	U	○	U	U	U	○	○	I	○	○	U	○	○	0
8	q	U	○	○	○	○	○	○	○	○	○	U	○	○	○	U	●	○	○	I	○	○	○	○	○	5
16	q	○	○				●	●	U	○				○	U	U	●	○			○	U	○	○	○	25
18	q (total)	○	●	U	○	●	○	●	○	U	●	○	○	○	U	○	○	○	○	●	●	○	●	○	○	33.3
18	q (gr I)	○	●		○	●	○	●	○	U	●	○	○	○	U	○	○	○	○	●	●	○	●	○	○	33.3
18	q (gr II)	U	●	U	U	○	○	U	U	U	○	U	U	○	U	○	○	U	○		○	○	●	○	○	15.4

หมายเหตุ ○ คือ retain heterozygote      ● คือ LOH positive      U คือ uninformative case  
 I คือ microsatellite instability      gr I คือ D18S55 + D18S70      gr II คือ D18S57

ตารางที่ 7 และ 8 แสดงรายละเอียดของการศึกษาภาวะ LOH ของทุกชิ้นเนื้อในมะเร็งตับปฐมภูมิ และมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมา แยกตาม loci บนโครโมโซมที่ทำการศึกษา

ชิ้นเนื้อที่เป็น U คือ uninformative case, I คือ microsatellite instability ไม่สามารถนำมาใช้ในการแปลผลได้ ดังนั้นจึงนำเฉพาะชิ้นเนื้อที่เป็น retain heterozygote (○) และชิ้นเนื้อที่มีภาวะ loss of heterozygote (●) มาใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ และในบางโครโมโซมมีการใช้ polymorphic markers มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง เช่นโครโมโซม 4q และ 18q เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบ informative case และนำมาใช้ได้ ดังนั้นในโครโมโซมดังกล่าวการแปลผลขั้นสุดท้ายจึงต้องพิจารณาแต่ละ loci ที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกันในทุกชิ้นเนื้อ ว่ามีตำแหน่งใดที่นำมาใช้ในการแปลผลได้ (แขนสั้นและแขนยาวบนโครโมโซมคู่เดียวกัน ต้องคิดแยกกันเนื่องจากอยู่คนละตำแหน่งกัน) แต่ในกรณีโครโมโซม 18q นั้นมีตำแหน่ง loci ที่ทำการศึกษาที่สามารถแยกเป็นสองตำแหน่งเมื่อคิดตามตำแหน่งบนโครโมโซม กลุ่มที่หนึ่งคือ loci D18S55 และ D18S70 นั้นตรงกับตำแหน่ง 18q22.1 และ 18q23 ซึ่งอยู่ใกล้เดียวกัน และกลุ่มที่สองคือ loci D18S57 ซึ่งตรงกับตำแหน่ง 18q12.2-13.3 ซึ่งอยู่ห่างไกลออกไปจากกลุ่มที่หนึ่ง ตารางที่ 9 และ 10 แสดงรายละเอียดของการศึกษาภาวะ LOH ในทุกชิ้นเนื้อโดยคิดรวมทุก polymorphic markers ที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกันในมะเร็งตับปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาตามลำดับ ตารางที่ 11 และ 12 แสดงสัดส่วนของภาวะ LOH ในแต่ละโครโมโซมที่คิดเฉพาะ informative case ในมะเร็งทั้งสองชนิด

ตารางที่ 11 แสดงสัดส่วนของภาวะ LOH เฉพาะ informative case คิดตามโครโมโซมที่ศึกษาในมะเร็งตับปฐมภูมิ

โครโมโซม	ชิ้นเนื้อที่แปลผลได้ (informative case)	ชิ้นเนื้อที่พบภาวะ LOH (LOH positive)	ร้อยละของภาวะ LOH (%)
1p	13	5	38.5
1q	16	4	25
4q	20	5	25
8q	17	2	11.8
16q	12	3	25
18q			
1. คิดรวมทุกตำแหน่ง	21	6	26.5
2. กลุ่มที่หนึ่ง (D18S55 และ D18S70)	20	3	15
3. กลุ่มที่สอง (D18S57)	11	4	36.4

ตารางที่ 12 แสดงสัดส่วนของภาวะ LOH เฉพาะ informative case คิดตามโครโมโซมที่ศึกษาในมะเร็ง  
 ตับชนิดอดติโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาจากที่อื่น

โครโมโซม	ชั้นเนื้อที่แปลผลได้ (informative case)	ชั้นเนื้อที่พบภาวะ LOH (LOH positive)	ร้อยละ (%)
1p	12	0	0
1q	19	2	10.5
4q	12	0	0
8q	20	1	5
16q	12	3	25
18q			
1. คิดรวมทุกตำแหน่ง	21	7	33.3
2. กลุ่มที่หนึ่ง (D18S55 และ D18S70)	21	7	33.3
3. กลุ่มที่สอง (D18S57)	13	2	15.4

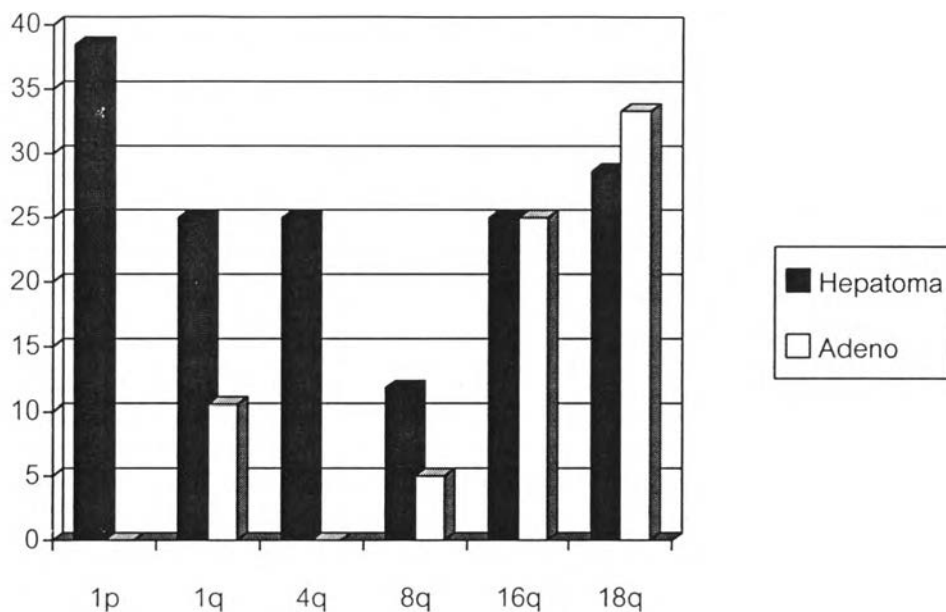
รูปที่ 17 แสดงกราฟเปรียบเทียบสัดส่วนของภาวะ LOH ที่พบในมะเร็งสองชนิด แยกตามโครโมโซม  
 ที่เลือกมาทำการศึกษาเฉพาะชั้นเนื้อที่สามารถแปลผลได้ (informative case)

รูปที่ 18 แสดงกราฟเปรียบเทียบสัดส่วนของภาวะ LOH เฉพาะโครโมโซม 18q คิดแยกตามตำแหน่ง  
 บนโครโมโซมที่อยู่ข้างเคียงกัน เปรียบเทียบระหว่างมะเร็งตับปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดอดติโนคาร์ซิโนมา

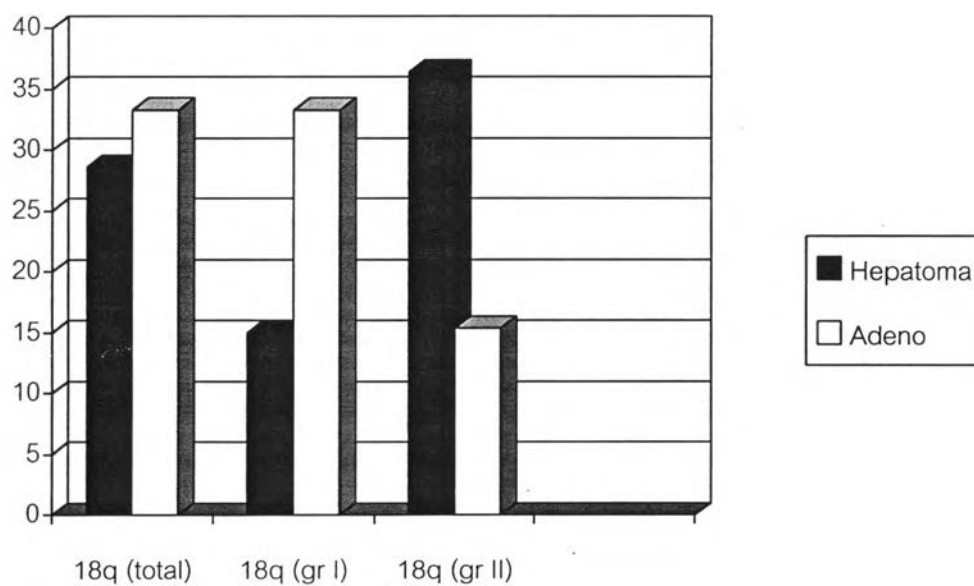
รูปที่ 19 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ในกลุ่มมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ โดยใช้ STRPs  
 loci ที่ตำแหน่ง D4S192 แสดงให้เห็นถึงลักษณะของชั้นเนื้อที่เป็น MSI, (ชั้นเนื้อ 3), uninformative case  
 (ชั้นเนื้อ 5) LOH positive (ชั้นเนื้อ 7, 11) และชั้นเนื้อที่เป็น retain LOH (ชั้นเนื้อ 9)

รูปที่ 20 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ในกลุ่มมะเร็งตับชนิดอดติโนคาร์ซิโนมา โดยใช้  
 STRPs loci ที่ตำแหน่ง D18S55

ผลการวิจัยพบสัดส่วนของภาวะ LOH ในมะเร็งตับปฐมภูมิตั้งแต่ร้อยละ 11.5 ไปจนถึงร้อยละ 38.5  
 โดยพบมากที่สุดบนโครโมโซม 1p ตำแหน่ง AMY-2B ร้อยละ 38.5 โครโมโซมที่พบภาวะ LOH ในสัดส่วน  
 รองลงมาคือโครโมโซม 18q ตำแหน่ง D18S57 ร้อยละ 36.4 ส่วนโครโมโซมที่พบภาวะ LOH น้อยที่สุดคือ  
 โครโมโซม 8q โดยพบเพียงร้อยละ 11.8 เท่านั้น ส่วนโครโมโซม 1q, 4q และ 16q พบภาวะ LOH ร้อยละ 25  
 ส่วนในมะเร็งตับชนิดอดติโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาจากอวัยวะอื่นพบภาวะ LOH ในสัดส่วนที่มากที่สุดบน  
 โครโมโซม 18q ร้อยละ 33.3 โครโมโซมคู่ที่พบอ้อยรองลงมาคือโครโมโซม 16q พบภาวะ LOH ร้อยละ 25  
 ในขณะที่โครโมโซม 1p และ 4q นั้นไม่พบภาวะ LOH เลย ส่วนโครโมโซม 8q และ 1q พบภาวะ LOH ใน  
 อัตราที่น้อยมากคือร้อยละ 5 และร้อยละ 10.5 ตามลำดับ

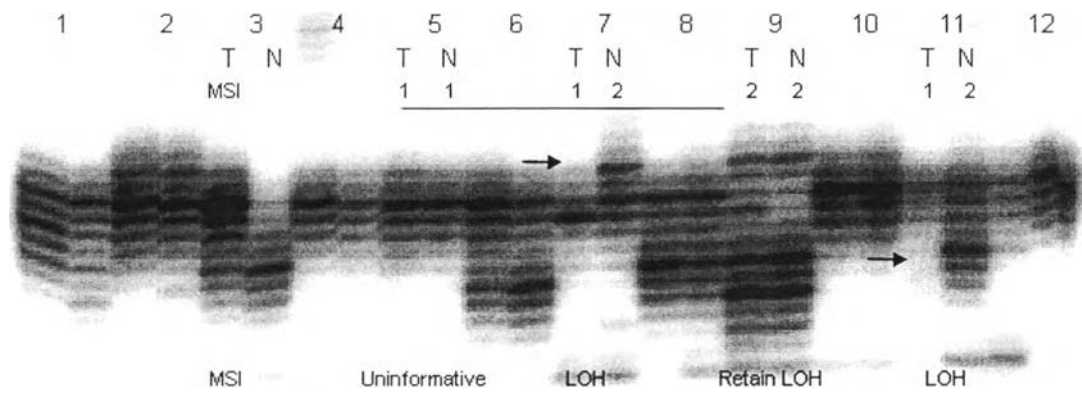


รูปที่ 17 กราฟเปรียบเทียบสัดส่วนของภาวะ LOH ในมะเร็งตับปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาแยกตามโครโมโซมและคิดเฉพาะชิ้นเนื้อที่นำมาแปลผลได้

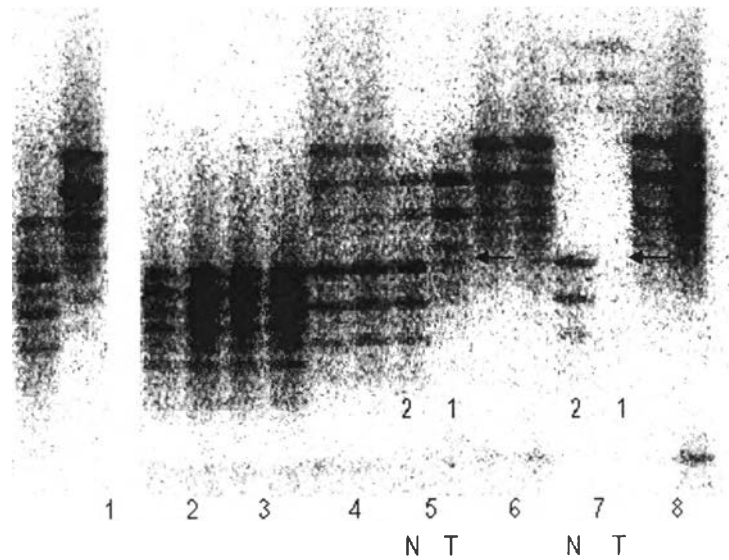


รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบสัดส่วนของภาวะ LOH ในมะเร็งตับปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาแสดงรายละเอียดเฉพาะโครโมโซม 18q





รูปที่ 19 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ในมะเร็งตับปฐมภูมิที่ตำแหน่ง STRPs loci D4S192 แสดงให้เห็นถึงลักษณะของชิ้นเนื้อที่เป็น MSI (ชิ้นเนื้อที่ 3), uninformative (ชิ้นเนื้อที่ 5) LOH positive (ชิ้นเนื้อที่ 7, 11) และชิ้นเนื้อที่เป็น retain LOH (ชิ้นเนื้อที่ 9)



รูปที่ 20 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ในมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาที่ตำแหน่ง STRPs loci D18S55 ซึ่งมีภาวะ LOH (ชิ้นเนื้อที่ 5 และ 7)

ภาวะ MSI ที่แสดงถึงความผิดปกติของ miss-matched repair genes พบเป็นจำนวนน้อยมากใน มะเร็งทั้งสองกลุ่ม โดยในมะเร็งตับปฐมภูมิพบเพียง 1 ชิ้นเนื้องอกโครโมโซม 1p, 4q, 8q และ 18q และไม่พบเลยบนโครโมโซม 1q ส่วนในมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาจากที่อื่นนั้น พบภาวะ MSI ได้เพียง 1 ชิ้นเนื้องอกโครโมโซม 1p, 1q, 4q และ 8q

2. ทดสอบความแตกต่างของสัดส่วนของภาวะ LOH ที่พบบนโครโมโซมที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง มะเร็งตับชนิดปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาโดยใช้ Chi-square test โดยคิด เฉพาะชิ้นเนื้อที่เป็น informative case เท่านั้น ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนของการพบ LOH ระหว่างมะเร็งตับปฐมภูมิและมะเร็งตับดีโนคาร์ซิโนมาโดย Chi-square test และ Fisher's Exact Test (Two-tail)

โครโมโซม	ชนิดมะเร็ง	retain	LOH	Total	Fisher's Exact test
		heterozygote	positive		
1p	1. มะเร็งตับปฐมภูมิ	8	5	13	0.03913*
	2. มะเร็งตับดีโน	12	0	12	
1q	1. มะเร็งตับปฐมภูมิ	12	4	16	0.37914
	2. มะเร็งตับดีโน	17	2	19	
4q	1. มะเร็งตับปฐมภูมิ	15	5	20	0.13009
	2. มะเร็งตับดีโน	12	0	12	
8q	1. มะเร็งตับปฐมภูมิ	15	2	17	0.58430
	2. มะเร็งตับดีโน	19	1	20	
16q	1. มะเร็งตับปฐมภูมิ	9	3	12	1.0000
	2. มะเร็งตับดีโน	9	3	12	
18q	1. มะเร็งตับปฐมภูมิ	13	8	21	1.0000
	2. มะเร็งตับดีโน	14	7	21	

\* แสดงถึงความแตกต่างของสัดส่วนของภาวะ LOH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า p-value < 0.05

ผลการทดสอบความแตกต่างของอัตราการพบภาวะ LOH บนโครโมโซมที่ทำการศึกษาระหว่างมะเร็งตับปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดดีโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาจากที่อื่น พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% บนโครโมโซม 1p โดยมีค่า p-value ที่ 0.03 ส่วนโครโมโซม 4q ซึ่งเป็นโครโมโซมอีกคู่หนึ่งที่มีความแตกต่างกันของการพบภาวะ LOH ระหว่างมะเร็งตับทั้งสองชนิดพอสมควร

คือไม่พบภาวะ LOH เลยบนโครโมโซมคู่นี้ในกลุ่มมะเร็งตับอดีโนคาร์ซิโนมาในขณะที่พบประมาณร้อยละ 25 ในมะเร็งตับปฐมภูมิ จากการทดสอบทางสถิติพบว่าค่า p-value ยังไม่ถึงระดับที่จะมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% ส่วนโครโมโซม 16q และ 18q นั้นไม่มีความแตกต่างกันเลยของอัตราของการพบภาวะ LOH ระหว่างมะเร็งตับปฐมภูมิและมะเร็งตับชนิดอดีโนคาร์ซิโนมาที่แพร่กระจายมาจากที่อื่น

3. คำนวณความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ของภาวะ LOH ที่สามารถใช้ในการทำนายจากการพิจารณาข้อมูลของภาวะ LOH พบว่า ภาวะ LOH ของโครโมโซม 1p และ 4q นั้นอาจจะนำมาใช้ในการช่วยทำนายว่าเป็นมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิได้

#### 3.1 โครโมโซม 1p

ความไวของการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อพบภาวะ LOH คือ 38.5%

ความจำเพาะของการวินิจฉัยเมื่อมีภาวะ LOH คือ 100%

ความสามารถในการทำนายว่าเป็นมะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อการตรวจได้ผลบวก คือ 100%

ความสามารถในการทำนายว่าไม่ใช่มะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อผลการตรวจได้ผลลบคือ 60%

#### 3.2 โครโมโซม 4q

ความไวของการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อมีภาวะ LOH คือ 25%

ความจำเพาะของการวินิจฉัยเมื่อมีภาวะ LOH คือ 100%

ความสามารถในการทำนายว่าเป็นมะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อการตรวจได้ผลบวก คือ 100%

ความสามารถในการทำนายว่าไม่ใช่มะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อผลการตรวจได้ผลลบคือ 44%

#### 3.3 โครโมโซม 1p ร่วมกับ 4q

ความไวของการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อมีภาวะ LOH คือ 38%

ความจำเพาะของการวินิจฉัยเมื่อมีภาวะ LOH คือ 100%

ความสามารถในการทำนายว่าเป็นมะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อการตรวจได้ผลบวก คือ 100%

ความสามารถในการทำนายว่าไม่ใช่มะเร็งตับปฐมภูมิเมื่อผลการตรวจได้ผลลบคือ 58%