

การประเมินคุณภาพชุดน้ำยาตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR เพื่อขึ้นทะเบียนจำหน่ายในกรณีเร่งด่วน

ดนตรี ช่างสม¹ สิริพรรณ แสงอรุณ¹ ธนัสภา ธนเดชากุล¹ จูติพร ห่านตระกูล¹ โสภิตา กาหลง¹
ชั้นธิวา ชัยราช¹ นันทวรรณ เมฆา¹ พิไลลักษณ์ อัครไพบุลย์ โอภาตะ¹ นภวรรณ เจนใจ¹
มาลินี จิตตกานต์พิชัย² และบัลลังก์ อุปพงษ์¹

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์
นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การประเมินคุณภาพเพื่อขึ้นทะเบียนจำหน่ายในกรณีเร่งด่วนของชุดน้ำยาตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR นี้ เป็นภารกิจของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการตรวจสอบมาตรฐานเครื่องมือแพทย์ เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการในการพิจารณาเลือกใช้ชุดน้ำยาที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งจะลดความผิดพลาดต่อการตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อ การประเมิน ประกอบด้วยการประเมินเอกสารกำกับชุดน้ำยาและการประเมินทางห้องปฏิบัติการ ทดสอบด้วยตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างบวก 5 ตัวอย่าง เพื่อประเมินความไวเชิงวิเคราะห์ และตัวอย่างลบ 5 ตัวอย่าง เพื่อประเมินความจำเพาะ ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ รวมทั้งหมด 30 ปฏิกริยา โดยใช้ RNA ที่สกัดจากเชื้อ SARS-CoV-2 เป็นตัวอย่างในการประเมินเพื่อให้มียื่นเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อทุกน้ำยาทดสอบ ได้แก่ ยีน *N*, *ORF1a/ab*, *E*, *RdRp* และ *S* การศึกษานี้ได้ประเมินชุดน้ำยาทั้งสิ้น 41 ชุดน้ำยา มีชุดน้ำยาที่ผ่านการประเมิน 36 ชุดน้ำยา (88%) ไม่ผ่านเกณฑ์ความไวเชิงวิเคราะห์ที่กำหนดร้อยละ 80 จำนวน 3 ชุดน้ำยา (7%) และไม่ผ่านเกณฑ์ความจำเพาะที่กำหนดร้อยละ 99.8 จำนวน 2 ชุดน้ำยา (5%) และไม่พบว่าการกระจายของค่า cycle threshold (Ct) ของทุกชุดน้ำยามีความแตกต่างกันในทุกยื่นเป้าหมาย ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานต้องศึกษาข้อมูลก่อนเลือกใช้ชุดน้ำยาเพื่อให้การรายงานผลเป็นไปอย่างถูกต้อง

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสโคโรนา 2019, real-time PCR, การประเมินคุณภาพชุดตรวจ

Corresponding author E- mail: don.c@dmasc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 7 August 2020

Accepted: 10 August 2020

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือโรคโควิด-19 (Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)) พบผู้ติดเชื้อยืนยันครั้งแรกเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 ในเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน ก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดไปยังทุกภูมิภาคทั่วโลก ซึ่งองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ประกาศให้การแพร่ระบาดเข้าสู่ภาวะ pandemic เมื่อวันที่ 11 มีนาคม 2563 จากข้อมูลถึงวันที่ 8 สิงหาคม พ.ศ. 2563 มีการยืนยันผู้ติดเชื้อทั่วโลกมากกว่า 18 ล้านราย เสียชีวิตมากกว่า 7 แสนราย⁽¹⁾ เชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 ที่เป็นสาเหตุของโรค COVID-19 มีรหัสพันธุกรรมที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสโคโรนาที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง หรือโรคซาร์ส (SARS, Severe acute respiratory syndrome) ที่เคยระบาดในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2545 จึงได้มีการระบุชื่อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่นี้ว่าเป็นไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงชนิดที่สอง (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) โดยเมื่อทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV และ SARS-CoV-2 พบว่าเชื้อไวรัสโคโรนาทั้งสองชนิดถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Betacoronavirus และในกลุ่มย่อย Sarbecovirus (lineage B) ร่วมกับเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ที่พบในค้างคาว⁽²⁾

เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 มีรหัสพันธุกรรมชนิด RNA สายบวกสายเดี่ยว (positive single-stranded RNA) ยาวประมาณ 30,000 คู่เบส ประกอบด้วยส่วน open reading frame (ORF) 1a และ 1b ที่ encode nonstructural protein (nsp) และส่วนที่ encode structural protein ได้แก่ S (spike), E (envelope), M (membrane) และ N (nucleocapsid) องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้วิธี nucleic acid amplification tests (NAAT) เช่น RT-PCR ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บจากทางเดินหายใจ⁽³⁾ วิธีที่พัฒนาขึ้นมีขึ้นเป้าหมาย ได้แก่ ยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ที่อยู่บน ORF1ab ยีน E, N และ S^(4, 5, 6, 7)

ในประเทศไทยมีการพบผู้ติดเชื้อรายแรกเมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2563 จากข้อมูลวันที่ 8 สิงหาคม พ.ศ. 2563 พบผู้ติดเชื้อในประเทศ 3,330 ราย เสียชีวิต 58 ราย⁽¹⁾ สำหรับการรองรับสถานการณ์โรคปอดอักเสบจากเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้ยกระดับศูนย์ปฏิบัติการภาวะฉุกเฉินเป็นระดับกระทรวงสาธารณสุข เพื่อติดตามสถานการณ์โรคทั้งในประเทศและต่างประเทศอย่างใกล้ชิด และเสริมสร้างความเข้มแข็งของระบบการเฝ้าระวังค้นหาผู้ป่วยกรณีโรคปอดอักเสบจากเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) โดยการทำงานแบบบูรณาการทุกกระทรวง รวมทั้งประสานงานกับองค์การอนามัยโลกและประเทศในอาเซียน เพื่อดำเนินการอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยมาตรฐานระดับสูงสุดในการป้องกันควบคุมโรคติดต่อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งมีภารกิจหลักตามกฎหมายในการเป็นห้องปฏิบัติการแห่งชาติด้านการแพทย์และสาธารณสุข จึงได้รับมอบหมายจากกระทรวงสาธารณสุข ให้กำกับ ดูแลด้านห้องปฏิบัติการ ทั้งการพัฒนานวัตกรรมวินิจฉัยที่แม่นยำ รวดเร็ว เพื่อให้ทันต่อการรักษาผู้ป่วยและการควบคุมโรค ถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจให้กับห้องปฏิบัติการเครือข่ายทั่วประเทศ กำกับ ดูแลมาตรฐานห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบมาตรฐานเครื่องมือแพทย์ การประเมินน้ำยาสำเร็จรูป (commercial test kit) สำหรับเป็นข้อมูลประกอบการขึ้นทะเบียนตาม พ.ร.บ.เครื่องมือแพทย์ ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.)⁽⁸⁾ ทุกกิจกรรมดังกล่าวต้องดำเนินการเร่งด่วนรองรับสถานการณ์ COVID-19 ของประเทศ

การประเมินคุณภาพของชุดน้ำยาตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR เพื่ออนุญาตให้จำหน่ายในประเทศไทยเป็นกรณีเร่งด่วนเริ่มขึ้นในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 ในช่วงที่พบการระบาดของโรคสูงขึ้นในประเทศ พร้อม ๆ กับที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้รับมอบหมายจากกระทรวงสาธารณสุขให้วางแผน

พัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลทุกจังหวัดให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้ ภายใต้นโยบาย 1 แล็บ 1 จังหวัด 100 ห้องปฏิบัติการ ในเวลานั้นการนำเข้าผลิตภัณฑ์ชุดน้ำยาดตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ SARS-CoV-2 จากบริษัทผู้ผลิตในต่างประเทศซึ่งมีจำนวนมากและหลากหลาย โดยชุดน้ำยาดทดสอบส่วนหนึ่งเป็น research used only (RUO) ซึ่งยังไม่ผ่านการทดสอบความใช้ได้กับตัวอย่างผู้ป่วยอย่างเต็มรูปแบบ

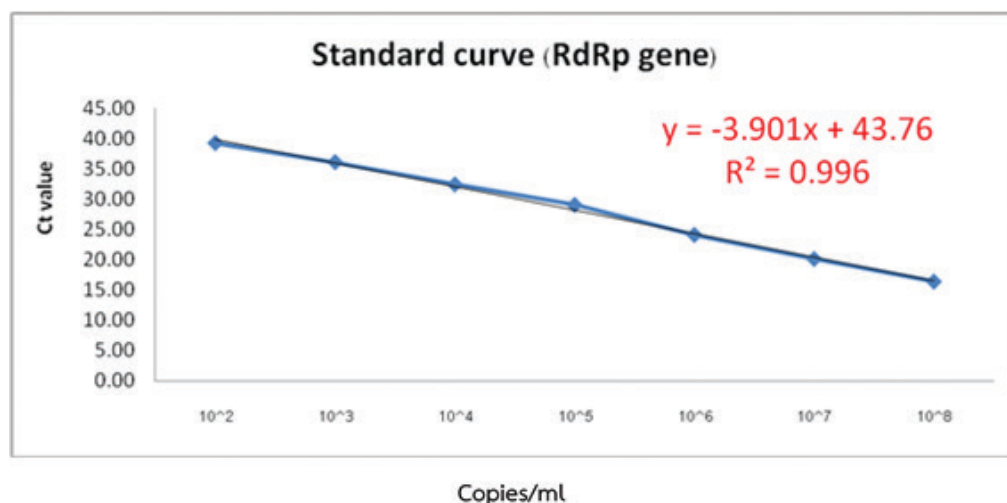
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้ทำการประเมินชุดน้ำยาดดังกล่าว เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและคุณภาพให้เป็นไปตามมาตรฐาน โดยจะเป็นประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการในการพิจารณาเลือกใช้ชุดน้ำยาได้อย่างมั่นใจ และสอดคล้องกับมาตรฐานที่กำหนด

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างวัตถุทดสอบ

ชุดน้ำยามีความหลากหลายจากการใช้ primers และ probes ที่ออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับยีนหลายตำแหน่งของเชื้อ SARS-CoV-2 การประเมินนี้ได้เลือกใช้ RNA ที่สกัดจากเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยรหัส hCoV-19/Thailand/74/2020 (Accession ID:EPI_ISL_403963) ซึ่งวิเคราะห์ยีนโนมทั้งเส้น (whole genome sequence) แล้วพบว่ามีความเหมือนกับยีนโนม hCoV-19/Wuhan/IPBCAMSWH-01/2019 (Accession ID:EPI_ISL_402123) ร้อยละ 100⁽⁹⁾ มาเป็นตัวอย่างสำหรับการประเมิน

ไวรัสถูกเลี้ยงและเพิ่มจำนวนในเซลล์ Vero จากนั้นทำการสกัด RNA จากน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture supernatant) โดยใช้ชุดสกัด NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL, Germany) แล้วคำนวณเพื่อหาปริมาณ copies/ml ของตัวอย่าง โดยการเตรียม mRNA จาก plasmid ที่มียีน RdRp ของเชื้อ hCoV-19/Thailand/74/2020 ด้วยวิธี *in vitro* transcription โดยใช้ชุด MAXIscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) นำ mRNA มาเจือจางก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี real-time RT-PCR และสร้าง standard calibration curve เป็นความสัมพันธ์ของ cycle threshold (Ct) กับปริมาณ copies/ml (ภาพที่ 1) แล้วจึงนำค่า Ct จากการทดสอบกับตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นมาเทียบกับ standard curve เพื่อคำนวณกลับเป็นปริมาณ copies/ml



ภาพที่ 1 Standard calibration curve ระหว่างค่า Ct value กับปริมาณ copies/ml ของยีน RdRp จากการทำ *in vitro* transcription

สำหรับการประเมินชุดน้ำยาได้เจือจาง RNA ให้มีจำนวน 5 ความเข้มข้น สำหรับชุดน้ำยาที่ต้องประเมินโดยใช้ตัวอย่างที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด RNA ทดสอบโดยใช้ culture supernatant ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี heat inactivation ที่อุณหภูมิ 56° Celsius (°C) นาน 30 นาที⁽¹⁰⁾ มาทำการเจือจางจำนวน 5 ความเข้มข้นเช่นเดียวกัน ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำมาทดสอบ RT-PCR โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁴⁾ ตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นที่ใช้ในการประเมินถูกเตรียมขึ้นในครั้งเดียวกันก่อนจะถูกแบ่งลง centrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดละ 300 µl เก็บที่ -80 °C และจะถูกนำออกมาเมื่อจะทำการประเมินแต่ละครั้ง

การกำหนดเกณฑ์การประเมินทางห้องปฏิบัติการ

เกณฑ์การประเมินกำหนดจากการรวบรวมข้อมูลที่หน่วยงานทั้งในและต่างประเทศกำหนดไว้สำหรับการทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) นำมาวิเคราะห์และคัดเลือกค่าความไวเชิงวิเคราะห์ (analytical sensitivity) ที่เป็นมาตรฐาน และเป็นที่ยอมรับโดยสากล^(11, 12, 13) กำหนดให้ค่า LOD 95% (95% Limit of Detection) ไม่มากกว่า 20 copies/PCR reaction หรือไม่มากกว่า 1,000 copies/ml ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูล specification ของชุดน้ำยาที่ได้รับจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ที่ส่วนใหญ่มีค่า LOD อยู่ระหว่าง 100 - 1,000 copies/ml ส่วนความจำเพาะของวิธี (analytical specificity) ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 99.8 สำหรับทดสอบ cross-reactivity นั้นใช้เชื้อไวรัสกลุ่มที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ 4 ชนิด ได้แก่ influenza virus A, influenza virus B, respiratory syncytial virus (RSV) และ Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสจากห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยชุดน้ำยาที่จะผ่านเกณฑ์ความจำเพาะต้องไม่สามารถตรวจพบเชื้อทั้ง 4 ชนิดที่นำมาทดสอบนี้

การประเมินคุณภาพชุดน้ำยา

การประเมินเอกสารกำกับชุดน้ำยาและกล่องบรรจุ พิจารณาจากรายละเอียดข้อบ่งชี้การใช้งาน เกณฑ์การอ่านผล การแปลผลที่ชัดเจน มีข้อมูลการทดสอบความถูกต้องของวิธี (validation data) ความไวเชิงวิเคราะห์ต้องกำหนดค่า LOD ไม่มากกว่า 1,000 copies/ml และความจำเพาะของวิธีต้องระบุ primers และ probes ของยีนเป้าหมายอย่างน้อย 1 ยีน ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ SARS-CoV-2 และต้องระบุว่าได้ผ่านการทดสอบแล้วว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reactivity) กับ SARS-CoV, MERS-CoV และ human corona สายพันธุ์อื่นๆ เช่น NL-63 OC-43 229-E และ HKU-1 โดยบางชุดน้ำยาอาจจะระบุการตรวจหาโดยใช้ยีนคัดกรองเป็นยีนที่ตรวจจับไวรัสในกลุ่ม Sarbecovirus เช่น *E gene* และยีนที่มีความจำเพาะกับ SARS-CoV-2 เช่น ยีน *RdRP*, *ORF1ab*, *N* หรือ *S*

การทดสอบกับชุดตัวอย่าง ดำเนินการทดสอบชุดน้ำยาที่ส่งประเมินระหว่างวันที่ 1 มีนาคม ถึง 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2563 ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในเอกสารกำกับชุดน้ำยาแต่ละชนิด ใช้เกณฑ์และวิธีการแปลผลตามเอกสารกำกับชุดน้ำยาที่ส่งมาประเมินพร้อมกับชุดน้ำยาทดสอบโดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างบวก 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างลบ 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ร่วมกับตัวควบคุมบวกและลบของแต่ละชุดน้ำยา ทุกตัวอย่างดำเนินการทดสอบซ้ำจำนวน 3 การทดสอบ (triplicate) โดยยอมรับผลการทดสอบเมื่อค่า Ct ที่ได้ในแต่ละการทดสอบซ้ำแตกต่างกันไม่เกิน 5 cycle

- การทดสอบที่ยอมรับว่าผ่านเกณฑ์ความไวเชิงวิเคราะห์ (analytical sensitivity) เมื่อชุดน้ำยาให้ผลบวกกับตัวอย่างลำดับที่ 1-4 ทั้ง 3 การทดสอบซ้ำ โดยมีความสอดคล้องของตัวอย่างบวกมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 80 เมื่อให้ผลบวก 12 จาก 15 การทดสอบ หากชุดน้ำยาที่มีความไวที่สูงกว่าหรือมีประสิทธิภาพที่ดีสามารถให้ผลบวกถึงตัวอย่างลำดับที่ 5
- การทดสอบที่ยอมรับว่าผ่านเกณฑ์ความจำเพาะ (analytical specificity) เมื่อชุดน้ำยาให้ผลลบกับตัวอย่างลำดับที่ 6-10 ทั้ง 3 การทดสอบซ้ำ โดยมีความสอดคล้องของตัวอย่างลบเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อให้ผลลบ 15 จาก 15 การทดสอบ

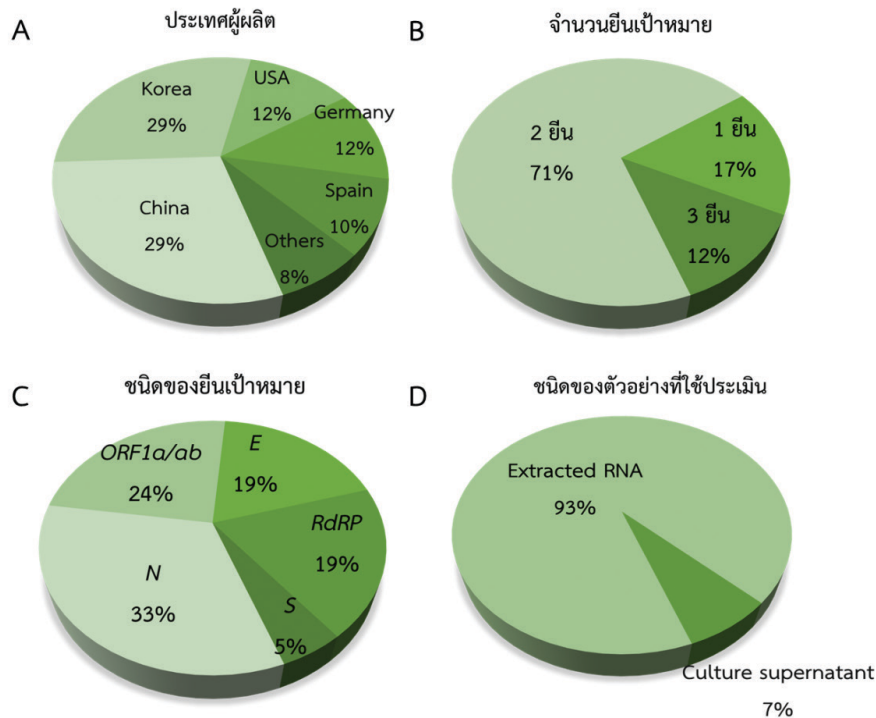
ตารางที่ 1 ชนิดของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบปริมาณ copies/ml ในแต่ละตัวอย่างจากการคำนวณเทียบกับ standard calibration curve และเกณฑ์การทดสอบ

ลำดับ	ชนิดตัวอย่าง RNA หรือ culture supernatant	จำนวน copies/ml	จำนวนการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์
ตัวอย่างบวก			
1	SARS-CoV-2-1	400,000 ($\pm 40,000$)	ผลบวก 3/3 การทดสอบ
2	SARS-CoV-2-2	40,000 ($\pm 4,000$)	ผลบวก 3/3 การทดสอบ
3	SARS-CoV-2-3	4,000 (± 400)	ผลบวก 3/3 การทดสอบ
4	SARS-CoV-2-4	2,000 (± 200)	ผลบวก 3/3 การทดสอบ
5	SARS-CoV-2-5	500 (± 50)	อาจได้ผลบวกหรือผลลบ
ตัวอย่างลบ			
1	Influenza A	-	ผลลบ 3/3 การทดสอบ
2	Influenza B	-	ผลลบ 3/3 การทดสอบ
3	RSV	-	ผลลบ 3/3 การทดสอบ
4	MERS-CoV	-	ผลลบ 3/3 การทดสอบ
5	Distilled water or VTM	-	ผลลบ 3/3 การทดสอบ

ผล

ภาพรวมของชุดน้ำยาที่ได้รับการประเมิน

ระหว่างวันที่ 1 มีนาคม ถึง 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2563 มีชุดน้ำยาถูกส่งมาประเมินทั้งสิ้น 41 ชุดน้ำยาจาก 8 ประเทศผู้ผลิต ได้แก่ จีน และเกาหลีใต้ จำนวนประเทศละ 12 ชุด สหรัฐอเมริกา และเยอรมนี จำนวนประเทศละ 5 ชุด สเปน 4 ชุด และประเทศอื่นๆ (สหราชอาณาจักร มาเลเซีย สิงคโปร์) ประเทศละ 1 ชุดน้ำยา (ภาพที่ 2A) ชุดน้ำยาจำนวน 29 ชุดน้ำยา (71%) มียีนเป้าหมาย 2 ยีน 7 ชุดน้ำยา (17%) มียีนเป้าหมาย 1 ยีน และมี 5 ชุดน้ำยา (12%) ที่มียีนเป้าหมาย 3 ยีน (ภาพที่ 2B) โดยยีนเป้าหมายที่ถูกเลือกใช้มากที่สุดคือ ยีน N (26 ชุดน้ำยา) ตามด้วย *ORF1a/ab*, *E*, *RdRp* และ *S* จำนวน 19, 15, 15 และ 4 ชุดน้ำยาตามลำดับ (ภาพที่ 2C) มีชุดน้ำยาที่ต้องใช้ตัวอย่าง culture supernatant ที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด RNA ในการประเมินจำนวน 3 ชุดน้ำยา (ภาพที่ 2D) รายละเอียดและรายละเอียดบางส่วน of ชุดน้ำยาที่ได้รับการประเมินแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 2 ข้อมูลของชุดน้ำยาจำนวน 41 ชุด ที่ได้ทำการประเมิน จำแนกตามประเทศผู้ผลิตชุดน้ำยา (A) จำนวนของยีนเป้าหมายของแต่ละชุดน้ำยา (B) ชนิดของยีนเป้าหมาย (C) และ ชนิดของตัวอย่างที่ใช้ประเมิน (D)

ผลการประเมินชุดน้ำยา

ชุดน้ำยาที่ผ่านการประเมินทั้งหมด 36 ชุดน้ำยา (ร้อยละ 88) และมีชุดน้ำยาที่ไม่ผ่านการประเมินทั้งหมด 5 ชุดน้ำยา (ร้อยละ 12) ประกอบด้วยชุดน้ำยาที่มีความสอดคล้องของตัวอย่างบวกน้อยกว่าร้อยละ 80 (ไม่ผ่านเกณฑ์ความไว) จำนวน 3 ชุดน้ำยา และมีผลความสอดคล้องของตัวอย่างลบน้อยกว่าร้อยละ 100 (ไม่ผ่านเกณฑ์ความจำเพาะ) จำนวน 2 ชุดน้ำยา (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการประเมินชุดน้ำยาตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 41 ชุดน้ำยา (ข้อมูลถึงวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2563)

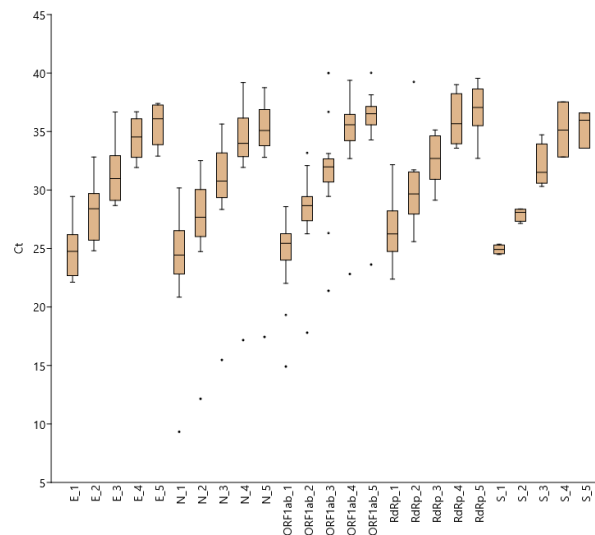
ผลประเมิน	จำนวนครั้งที่ทดสอบผ่าน (ความสอดคล้อง)	จำนวนชุดน้ำยา (ร้อยละ)
ความไว - ผ่านเกณฑ์	15 จาก 15 การทดสอบ (ร้อยละ 100)	30 (ร้อยละ 73)
	14 จาก 15 การทดสอบ (ร้อยละ 93)	2 (ร้อยละ 5)
	13 จาก 15 การทดสอบ (ร้อยละ 87)	3 (ร้อยละ 7)
	12 จาก 15 การทดสอบ (ร้อยละ 80)	1 (ร้อยละ 3)
ความไว - ไม่ผ่านเกณฑ์	น้อยกว่า 12 จาก 15 การทดสอบ ในตัวอย่างบวก (ต่ำกว่าร้อยละ 80)	3 (ร้อยละ 7)
ความจำเพาะ - ไม่ผ่านเกณฑ์	ผลลบน้อยกว่า 15 จาก 15 การทดสอบ ในตัวอย่างลบ (ต่ำกว่าร้อยละ 100)	2 (ร้อยละ 5)

การวิเคราะห์ค่า **cycle threshold**

ทำการวิเคราะห์ค่า cycle threshold (Ct) จากชุดน้ำยาที่ใช้ RNA เป็นตัวอย่างจำนวน 36 ชุดน้ำยา โดยไม่รวมชุดน้ำยาที่ใช้ culture supernatant ในการประเมิน เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ประเมินแตกต่างกัน และไม่รวมชุดน้ำยาที่ไม่ผ่านเกณฑ์ specificity เนื่องจากค่า Ct ที่ได้จากการทดสอบไม่คงที่ ค่า Ct จากการประเมินด้วยตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (linear relationship) กับค่า log ของ dilution ($R^2 = 0.99$) เมื่อเปรียบเทียบค่า Ct ที่ได้จากการทดสอบแต่ละยี่ห้อพบว่ามีค่า Ct ต่ำกว่ายี่ห้ออื่นในชุดน้ำยาตัวอย่าง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann-Whitney U Test, $p > 0.01$) (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาการกระจายของค่า Ct จาก %CV และ boxplot (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3) พบว่า ยี่ห้อ N มีการกระจายของค่า Ct สูงกว่ายี่ห้ออื่น ใกล้เคียงกับยี่ห้อ RdRp เนื่องจากชุดน้ำยาหนึ่งที่มียี่ห้อเป้าหมาย ยี่ห้อ N และ RdRp ให้ค่า Ct ที่ต่ำกว่าชุดน้ำยาส่วนใหญ่ในทุกตัวอย่าง ซึ่งเมื่อทำการคำนวณโดยไม่รวมค่า Ct ของชุดน้ำยานี้พบว่า %CV ของ ยี่ห้อ N และ RdRp จะมีค่าใกล้เคียงกับยี่ห้ออื่น ส่วน ยี่ห้อ S มีค่าการกระจายต่ำเนื่องจากมีจำนวนชุดน้ำยาที่ใช้ ยี่ห้อ S เป็นยี่ห้อเป้าหมายเพียง 4 ชุดน้ำยาเท่านั้น

ตารางที่ 3 ค่า Ct จากชุดน้ำยาที่ทดสอบกับตัวอย่าง RNA ในแต่ละความเข้มข้น แยกตามยี่ห้อเป้าหมาย

ตัวอย่าง		ชนิดของยีนเป้าหมาย (จำนวนชุดน้ำยา)				
		<i>E</i> (13)	<i>N</i> (22)	<i>ORF1a/ab</i> (19)	<i>RdRp</i> (13)	<i>S</i> (4)
1	Median Ct	24.8	24.4	25.4	26.2	24.9
	(range)	(22.1–29.4)	(9.3–30.2)	(14.9–28.6)	(22.4–32.2)	(24.5–25.4)
	%CV	8.7	16.6	12.5	9.5	1.5
2	Median Ct	28.4	27.7	28.7	29.7	28.1
	(range)	(24.8–32.8)	(12.2–32.5)	(17.8–33.2)	(25.6–39.2)	(27.1–28.4)
	%CV	8.3	15.0	10.9	11.4	2.0
3	Median Ct	31.0	30.8	31.9	32.7	31.5
	(range)	(28.7–36.7)	(15.5–35.6)	(21.4–36.7)	(29.1–35.1)	(30.3–34.7)
	%CV	7.6	13.1	9.9	6.4	5.9
4	Median Ct	34.5	34.0	35.6	35.7	35.1
	(range)	(31.9–36.7)	(17.2–39.2)	(22.8–39.4)	(33.6–39.0)	(32.8–37.5)
	%CV	4.9	12.8	9.5	5.4	6.7
5	Median Ct	36.1	35.1	36.5	37.1	36.0
	(range)	(32.9–37.4)	(17.4–38.8)	(23.6–40.0)	(32.7–39.6)	(33.6–36.6)
	%CV	4.8	12.7	9.0	5.7	4.5



ภาพที่ 3 Boxplot แสดงการกระจายของค่า Ct (แกน Y) เมื่อทดสอบกับตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น (แกน X) แยกตามยีนเป้าหมาย 5 ยีน ที่ระบุตามเอกสารกำกับของแต่ละชุดน้ำยา ได้แก่ ยีน *E* (n=13), *N* (n=22), *ORF1a/ab* (n=19), *RdRp* (n=13) และ ยีน *S* (n=4) วงกลมสีดำแสดงค่า Ct ที่แตกต่างจากกลุ่มค่า Ct ส่วนใหญ่ (outlier)

การประเมินความแตกต่างระหว่างรุ่นการผลิตของชุดน้ำยา

ในการประเมินนี้มี 2 ชุดน้ำยา ที่ได้รับการประเมินมากกว่า 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งก็นำมาประเมินจะมีรุ่นการผลิต (lot) ต่างกัน (ตารางที่ 4) พบว่าชุดน้ำยา A1 ที่ได้ทำการประเมิน 4 ครั้ง มียีนเป้าหมายคือ ยีน *ORF1a/ab* และ ยีน *N* ค่า Ct ของแต่ละตัวอย่างมีค่า SD น้อยกว่า 2.0 ยกเว้นในตัวอย่างที่ 2 ที่มีค่า Ct หนึ่งครั้งแตกต่างจากค่าอื่น ชุดน้ำยา A2 ได้รับการประเมิน 3 ครั้ง มียีนเป้าหมายคือ ยีน *E*, *ORF1a/ab* และ ยีน *N* พบว่า ยีน *E* และ ยีน *N* มีค่า SD มากกว่า 2.0 ในทุกตัวอย่าง ขณะที่ ยีน *ORF1a/ab* มีค่า SD น้อยกว่า 2.0 ในทุกตัวอย่างเช่นกัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบชุดน้ำยาที่ได้ทำการประเมินความแตกต่างระหว่างรุ่นการผลิต (lot-to-lot variation)

ชุดน้ำยา จำนวนครั้งที่ประเมิน		อื่นเป้าหมาย	1		2		3		4		5	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
A1	4	<i>N</i>	25.2	0.3	29.9	3.0	32.3	1.8	35.2	1.3	36.3	1.6
		<i>ORF1a/ab</i>	27.4	0.9	31.8	2.7	34.2	1.2	37.0	0.9	38.5	1.2
A2	3	<i>E</i>	25.4	2.5	28.6	2.6	31.8	2.7	35.1	2.8	36.9	3.5
		<i>N</i>	28.2	3.6	31.2	3.5	34.4	3.9	38.2	4.5	38.6	3.3
		<i>ORF1a/ab</i>	27.4	1.2	30.4	1.1	33.6	1.2	37.4	1.3	38.0	1.6

ตารางที่ 5 รายชื่อชุดน้ำยาที่ได้รับการประเมินตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 (ข้อมูลถึงวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2563)

	ชื่อน้ำยา	บริษัทผู้ผลิต	ความจำเพาะของชิ้น	ระบุเครื่องเฉพาะ	ระบุตั้งค่า threshold	เวลาที่ใช้โดยประมาณ (thermal cycling time) (นาที)	Ct cut-off	อื่น ๆ
1	1copy™ COVID-19 qPCR Multi Kit	1drop Inc., Korea	1. Betacoronavirus <i>E</i> 2. SARS-CoV-2 <i>RdRp</i>			80	≤40	
2	ab TES™ 2019-nCoV qPCR I Kit (v1.0)	AIT Biotech, Singapore	1. SARS-CoV-2 <i>NS1</i> 2. SARS-CoV-2 <i>NS2</i>			70	amplification curve	
3	Abbott RealTime SARS-CoV-2 Amplification Reagent and Control Kits	Abbott Molecular Inc., USA	1. SARS-CoV-2 <i>RdRP</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>	Abbott m2000rt System		270	ไม่ระบุ	ใช้ตัวอย่าง VTM
4	AccuPower® SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR Kit	Bioneer Corp., Korea	1. Coronavirus <i>E</i> 2. SARS-CoV-2 <i>RdRP</i>			90	≤38	
5	Allplex™ 2019-nCoV Assay	Seegene, Inc. Korea	1. Sarbecovirus <i>E</i> 2. SARS-CoV-2 <i>RdRP</i> 3. SARS-CoV-2 <i>N</i>			90	≤40	
6	careGENE™ N-CoV RT-PCR kit	WELLS BIO, Inc., Korea	1. Coronavirus <i>E</i> 2. SARS-CoV-2 <i>RdRP</i>		✓	70	≤45	
7	Detection kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence PCR Probing)	DAAN Gene, China	1. SARS-CoV-2 ORF1ab 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			80	≤40	
8	DiaPlexQ™ Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit	Solgent Co., Ltd. Korea	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1a</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>		✓	75	≤40	
9	DirectPrep™ 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit	Coyote Bioscience Co., Ltd. China	1. SARS-CoV-2 ORF1ab 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			60	amplification curve	
10	GenePro COVID-19 Detection Test	Gencurix Inc., Korea	1. Coronavirus <i>E</i> 2. SARS-CoV-2 <i>RdRp</i>		✓	70	<40	
11	genesig® Real-Time PCR Coronavirus (COVID-19) CE IVD Kit	Primerdesign Ltd., United Kingdom	SARS-CoV-2 <i>RdRp</i>			60	amplification curve	
12	HBRT-COVID-19 Real-Time PCR Kit	Chaozhou HybriBio Biochemistry Ltd. China	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			60	≤40	
13	iLAMP Novel-CoV19 Detection Kit	iONEBIO Inc., Korea	SARS-CoV-2 <i>N</i>		✓	30	≤26	
14	Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes)	Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd., China	1. SARS-CoV-2 ORF1ab 2. SARS-CoV-2 <i>N</i> 3. SARS-CoV-2 <i>E</i>			70	≤41	
15	LightMix® Modular Sarbecovirus E-gene	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Germany	Sarbecovirus <i>E</i>	Light Cycler 480		70	<39	
16	LightMix® Modular SARS-CoV (COVID19) N-gene	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Germany	Sarbecovirus <i>N</i>	Light Cycler 480		70	<37	
17	LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID19) <i>RdRP</i>	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Germany	SARS-CoV-2 <i>RdRP</i>	Light Cycler 480		70	<39	
18	LiliF™ COVID-19 Real-time RT-PCR Kit	iNtRON Biotechnology, Korea	1. SARS-CoV-2 <i>RdRp</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i> 3. Betacoronavirus <i>E</i>		✓	90	<35	
19	Logix Smart COVID-19 Kit	Co-Diagnostics, Inc. USA	SARS-CoV-2 <i>RdRp</i>			90	<45	
20	LyteStar™ 2019-nCoV RT-PCR Kit 1.0	ADT Biotech, Malaysia	1. Sarbecovirus <i>E</i> 2. SARS-CoV-2 <i>RdRp</i>			120	≤45	
21	MolecuTech® Real-Time COVID-19	YD Diagnostics CORP. Korea	1. SARS-CoV-2 <i>RdRp</i> 2. Coronavirus <i>E</i>		✓	120	≤40	

ตารางที่ 5 รายชื่อชุดน้ำยาที่ได้รับการประเมินตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 (ข้อมูลถึงวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2563) (ต่อ)

	ชื่อน้ำยา	บริษัทผู้ผลิต	1. SARS-CoV-2 ORF1ab	ระบุเครื่องหมาย	ระดับค่า threshold	เวลาที่ใช้โดยประมาณ (thermal cycling time) (นาที)	Ct cut-off	อื่น ๆ
22	Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Detection Kit (PCR-Fluorescence Probing)	Shanghai BioGerm Medical Technology Co., Ltd., China	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			60	≤38	
23	Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescent Probing)	Sansure Biotech, China	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			90	≤40	
24	Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time PCR Kit	Jiangsu Biopertectus Technologies Co., Ltd. China	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			70	≤37	
25	Novel Coronavirus (2019-nCoV) RT-PCR Kit	Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., China	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			70	<37	
26	PCR/RT-PCR Kit Novel Coronavirus (2019-nCoV) Fluorescence RT-PCR Detection Kit	Hang Zhou Bioer Technology Co.Ltd	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			70	≤40	
27	PerkinElmer® New Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Detection Kit	Perkin Elmer, Inc. USA	1. SARS-CoV-2 <i>N</i> 2. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i>			104.5	≤42, ≤45	
28	PowerChek 2019-nCoV Real-time PCR Kit	KogeneBiotech Co., Ltd. Korea	1. Betacoronavirus <i>E</i> 2. SARS-CoV-2 <i>RdRp</i>			70	≤38	
29	QIAstat-Dx Respiratory 2019-nCoV Panel	QIAGEN, Germany	1. SARS-CoV-2 <i>RdRp</i> 2. SARS-CoV-2 <i>E</i>	QIAstat-DX Analyzer 1.0			<40	ใช้ตัวอย่าง VTM
30	RealStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0	Altona Diagnostics GmbH Germany	1. Betacoronavirus <i>E</i> 2. SARS-CoV-2 <i>S</i>			90	amplification curve	
31	Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV	BGI PathoGenesis Pharmaceutical Technology Co., Ltd. China	SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i>			70	<38	
32	SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit (PCR-Fluorescent Probe Method)	Zybio Inc., China	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			70	<40	
33	SARS-CoV-2 nucleic acid detection kit based on real-time PCR platform	Beijing Biogench Biotechnology Co., Ltd., China	1. SARS-CoV-2 <i>S</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			70	<36	
34	SARS-CoV-2 RT PCR	Vitro S.A. master diagnostics, Spain	1. SARS-CoV-2 <i>N</i> 2. Coronavirus <i>E</i>			70	amplification curve	
35	SMARTCHEK® Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Detection Kit	Genesystem Co., Ltd. Korea	1. SARS-CoV-2 <i>N</i> 2. SARS-CoV-2 <i>RdRp</i>	GENECHECKER UF-300Real-time PCR System		45	< 40	
36	TaqMan™ 2019 nCoV Assay Kit v1	Life Technologies Corporation, USA	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>S</i> 3. SARS-CoV-2 <i>N</i>			60	<37	
37	TaqMan™ 2019-nCoV Assay Kit v2	Life Technologies Corporation, USA	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>S</i> 3. SARS-CoV-2 <i>N</i>			60	<37	
38	VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 12x8-well strip, high profile	CERTEST Biotec, S. L., Spain	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			70	<38	12x8 well strips, high profile
39	VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 12x8-well strip, low profile	CERTEST Biotec, S. L., Spain	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			70	<38	12x8 well strips, low profile
40	Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (II)	Vitassay Healthcare, S.L.U., Spain	1. SARS-CoV-2 <i>ORF1ab</i> 2. SARS-CoV-2 <i>N</i>			80	amplification curve	SARS-CoV-2 (II) Strips
41	Xpert Xpress SARS CoV 2	Cepheid, USA	1. SARS-CoV-2 <i>N</i> 2. SARS-CoV-2 <i>E</i>	GeneXpert Dx System		45	ไม่ระบุ	ใช้ตัวอย่าง VTM

วิจารณ์

การศึกษานี้ได้ทำการประเมินชุดน้ำยาดตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ทั้งสิ้น 41 ชุดน้ำยา ผ่านการประเมิน 36 ชุดน้ำยา (88) ให้ผลผ่านการประเมินความไว (sensitivity) เมื่อชุดน้ำยาให้ผลบวกถึงตัวอย่างที่ 4 เป็นอย่างน้อย หรือไม่มากกว่า 1,000 copies/ml ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณของเชื้อในตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยจากการศึกษาที่รายงาน viral load ในตัวอย่าง throat swab ประมาณ 10^4 copies/ml โดยปริมาณต่ำสุดที่พบคือ 641 copies/ml⁽¹⁴⁾ ชุดน้ำยาที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินความไวนั้นให้ผลลบในตัวอย่างที่ 4 แม้ในเอกสารกำกับชุดน้ำยาระบุว่าชุดน้ำยามี LOD ต่ำกว่า 1,000 copies/ml เช่นเดียวกับชุดน้ำยาที่ไม่ผ่านการประเมินความจำเพาะ แม้ในเอกสารกำกับชุดน้ำยาระบุว่าได้ทำการทดสอบกับตัวอย่างที่มีเชื้อก่อโรคชนิดอื่นแล้ว แต่ยังอาจให้ผลบวกปลอม (false positive) ในการทดสอบกับตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งในการทดสอบเบื้องต้นของบริษัทผู้ผลิตชุดน้ำยานั้นอาจยังไม่ได้ทำการทดสอบกับตัวอย่างผู้ป่วย เนื่องจากในช่วงแรกของการระบาดนั้นยังไม่มีตัวอย่างผู้ป่วยให้ทดสอบอย่างเพียงพอ ดังนั้นการจะเลือกใช้ชุดน้ำยาในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการจึงต้องศึกษารายละเอียดในเอกสารกำกับชุดน้ำยาอย่างละเอียด หรือถ้าเป็นไปได้ควรทำการทดลองใช้ชุดน้ำยากับตัวอย่างผู้ป่วยที่ทราบผล

ชุดน้ำยาส่วนใหญ่มียีนเป้าหมายจำนวน 2 ยีน และยีนเป้าหมายที่ถูกใช้มากที่สุดคือ ยีน *N* เป็นจำนวน 26 ชุดน้ำยา มีชุดน้ำยาที่ใช้ยีน *E* เป็นยีนเป้าหมายจำนวน 15 ชุดน้ำยา โดยส่วนใหญ่มีการระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยาว่า primer/probe ต่อ ยีน *E* นั้นมีความจำเพาะกับไวรัสโคโรนาในกลุ่ม Sarbecovirus ซึ่งชุดน้ำยากลุ่มนี้มียีนเป้าหมายอื่นอย่างน้อยอีก 1 ยีน ที่มีความจำเพาะกับ SARS-CoV-2 และในการแปลผลจะรายงานผล SARS-CoV-2 เป็นบวกต่อเมื่อยีนเป้าหมายทั้งหมดในการทดสอบนั้นเป็นบวก หรือยีนอื่นที่มีความจำเพาะกับ SARS-CoV-2 เป็นบวก จากข้อมูลวิธีตรวจแบบ in house ที่พัฒนาขึ้นโดยห้องปฏิบัติการตามรายงานของ WHO⁽³⁾ ได้มีการใช้ ยีน *E* เป็นยีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะกับกลุ่ม Sarbecovirus และใช้ ยีน *RdRp* เป็นยีนเป้าหมายที่จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ในการตรวจยืนยัน การใช้ยีน *E* เป็นยีนเป้าหมายอาจไม่จำเพาะต่อ SARS-CoV-2 แต่อาจเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังเมื่อเชื้อเกิดการกลายพันธุ์ในยีนเป้าหมายอื่น หรือในกรณีที่เกิดการระบาดของเชื้อตัวใหม่ที่อยู่ในกลุ่ม Sarbecovirus ทำให้ primer/probe ที่มีความจำเพาะต่อยีนอื่นของ SARS-CoV-2 ไม่สามารถตรวจจับได้ แต่ในขณะที่ ยีน *E* ที่มีความจำเพาะกับกลุ่ม Sarbecovirus ยังสามารถตรวจจับได้⁽⁵⁾

การแปลผลนั้นขึ้นอยู่กับค่า *Ct* ซึ่งเป็นจำนวนรอบการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ real-time PCR ที่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ตัดกับเส้น threshold โดยในการแปลผลใช้ค่า *Ct* ที่ได้จากการทดสอบเทียบกับค่า *Ct* cut-off ที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยาแต่ละชุด ถ้าค่า *Ct* ของตัวอย่งนั้นต่ำกว่าค่า *Ct* cut-off แสดงถึงการพบ RNA ของยีนเป้าหมายในตัวอย่างนั้น แต่ถ้าสูงกว่าค่า *Ct* cut-off แสดงถึงตัวอย่างนั้นไม่มี RNA ของยีนเป้าหมาย หรือมีในปริมาณที่ต่ำกว่า limit of detection ของชุดน้ำยานั้น การตั้งค่า threshold อาจมีความแตกต่างในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบ และมีความแตกต่างกันตามยี่ห้อหรือรุ่นของเครื่อง real-time PCR ซึ่งอาจเป็นค่าที่จากการกำหนดเองของเครื่องภายหลังการทดสอบโดยการคำนวณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ หรือเป็นค่าที่กำหนดเองโดยผู้ปฏิบัติงานเพื่อลดสัญญาณรบกวนซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน^(15, 16) ในชุดน้ำยาที่ได้ทำการประเมินมี 6 ชุดน้ำยา ที่ระบุในเอกสารกำกับให้มีการตั้งค่า threshold ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ซึ่งมีข้อดีในการควบคุมให้การแปลผลคงที่โดยไม่มีการ bias จากผู้ปฏิบัติงาน แต่การปฏิบัติงานจริงในการทดสอบแต่ละครั้งมีหลายปัจจัยที่อาจมีผลต่อสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เช่น รุ่นของเครื่อง real-time PCR ที่ใช้งาน รุ่นการผลิตของชุดน้ำยา การขนส่งหรือการจัดเก็บชุดน้ำยาที่ไม่ถูกวิธีอาจส่งผลต่อความคงตัวของสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดอยู่กับ probe ทำให้เกิดความแปรปรวน

ของค่า Ct นอกจากนี้ในบางชุดน้ำยาไม่มีการระบุค่า Ct cut-off แต่ให้แปลผลจากการปรากฏของ amplification curve ซึ่งในบางกรณีในตัวอย่างทดสอบไม่มี RNA เป้าหมาย แต่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นใน cycle ที่สูงกว่า 40 ในปริมาณต่ำแล้วลักษณะของ curve ไม่เป็นแบบ exponential ซึ่งอาจเป็นผลจาก nonspecific binding ที่พบได้ใน cycle ที่สูงขึ้น ทำให้ผู้ปฏิบัติงานเข้าใจว่าเป็นสัญญาณจากยีนเป้าหมายและรายงานผลเป็นบวก ผลจากทั้งสองปัจจัยนี้ถ้าผู้ปฏิบัติงานขาดประสบการณ์อาจทำให้การอ่านค่า Ct และการแปลผลเกิดความผิดพลาดขึ้นได้⁽¹⁶⁾

เมื่อทำการทดสอบพบการกระจายของค่า Ct ที่ส่วนใหญ่มี %CV น้อยกว่า 10 ยกเว้นใน ยีน *N* และ *RdRp* ซึ่งมีชุดน้ำยาที่ได้ค่า Ct ต่ำกว่าชุดน้ำยาส่วนใหญ่แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า Ct แสดงถึงความไว (sensitivity) ของชุดน้ำยาในการตรวจจับยีนเป้าหมายซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ การออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และ probe ประสิทธิภาพของเอนไซม์ polymerase องค์ประกอบของ buffer ปริมาตรของ RNA ที่ใช้ในปฏิกิริยา การตั้ง parameter สำหรับ thermal cycling เป็นต้น รวมไปถึงรุ่นการผลิตของชุดน้ำยาชนิดเดียวกันที่อาจให้ค่า Ct ที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการทดสอบควรระบุชนิดของชุดน้ำยาและรุ่นการผลิตของชุดน้ำยาทุกครั้งเพื่อประโยชน์ในการทวนสอบ

มีชุดน้ำยาที่ผ่านการประเมินจำนวน 5 ชุดน้ำยา ที่ต้องใช้เครื่อง real-time PCR เฉพาะที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ได้แก่ บริษัท Abbott Molecular Inc. (Abbott m2000rt System), Roche Diagnostic (LightCycler 480 II), Sansure Biotech (SLAN-96P), QIAGEN (QIAstat-DX Analyzer 1.0) และ Cepheid (GeneXpert Dx System) ในการทำ real-time RT-PCR ของชุดน้ำยาของบริษัท Abbott Molecular Inc., QIAGEN และ Cepheid ดำเนินการโดยใช้โปรแกรมคำสั่งที่กำหนดโดยบริษัทผู้ผลิต ผู้ปฏิบัติงานไม่สามารถปรับเปลี่ยน parameter ใด ๆ ของ PCR cycle ได้ แต่ทั้ง 3 ชุดน้ำยา สามารถทดสอบโดยใช้ตัวอย่าง VTM ที่ไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการสกัด RNA ชุดน้ำยาของบริษัท Cepheid ใช้เวลาในการทดสอบน้อยที่สุดที่ประมาณ 45-50 นาที ในขณะที่ชุดน้ำยาของบริษัท QIAGEN ใช้เวลาประมาณ 60 นาที และของบริษัท Abbott Molecular Inc. ใช้เวลานานที่สุดที่ประมาณ 180 นาที ด้วยระบบการทำงานและขนาดของเครื่อง real-time PCR ของบริษัทที่แตกต่างกัน เครื่อง QIAstat-DX Analyzer 1.0 และ GeneXpert Dx System มีขนาดเล็ก สามารถทดสอบตัวอย่างในปริมาณน้อย ๆ ได้ทันที เหมาะจะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างทดสอบจำนวนไม่มาก ในขณะที่ Abbott m2000rt System สามารถดำเนินการทดสอบได้ครั้งละปริมาณมาก เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่ต้องทำการทดสอบหลายตัวอย่าง ส่วนชุดน้ำยาที่ใช้ตัวอย่าง RNA ที่ผ่านการสกัดในการทดสอบกับเครื่อง real-time PCR ใช้เวลาในการทำ RT-PCR (thermal cycling time) น้อยที่สุดที่ประมาณ 60 นาที ใช้เวลาสูงสุดที่ประมาณ 120 นาที โดยชุดน้ำยาส่วนใหญ่ (47%) ใช้เวลาประมาณ 70 นาที

สรุป

ชุดน้ำยาที่ได้รับการประเมินโดยส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกัน แต่รายละเอียดขั้นตอนการทำการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การตั้งค่า parameter สำหรับ thermal cycling การอ่านผลและการแปลผลของแต่ละชุดน้ำยามีรายละเอียดแตกต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อการทดสอบและการรายงานผล ผู้ปฏิบัติงานควรต้องศึกษาเอกสารกำกับชุดน้ำยาให้ละเอียดและเข้าใจทุกครั้งเพื่อลดปัจจัยที่อาจเป็นผลให้เกิดการรายงานผลที่ผิดพลาด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายโรคติดต่อทางเดินหายใจในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายไวรัสระบบทางเดินอาหาร และฝ่ายไวรัสระบบประสาท สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง real-time PCR ในการประเมินชุดน้ำยาบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard. [online]. 2020; [cited 2020 Jul 14]; [7 screens]. Available from: URL: <https://covid19.who.int>.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382(8): 727-33.
3. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance, 17 January 2020. [online]. 2020; [cited 2020 Jul 14]; [7 screens]. Available from: URL: [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-(2019-ncov)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020).
4. World Health Organization. Molecular assays to diagnose COVID-19: summary table of available protocols. [online]. 2020; [cited 2020 Jul 14]; [80 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>.
5. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25(3): 2000045. (8 pages).
6. Konrad R, Eberle U, Dangel A, Treis B, Berger A, Bengs K, et al. Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. *Euro Surveill* 2020; 25(9): 2000173. (5 pages).
7. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. (10 pages).
8. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การยื่นคำขอประเมิน การประเมิน และการออกใบรับรอง การประเมินชุดตรวจและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (เชื้อก่อโรค COVID-19) พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 107 ตอนพิเศษ 107 ง (วันที่ 5 พฤษภาคม 2563). หน้า 26-27.
9. Okada P, Buathong R, Phuygun S, Thanadachakul T, Parnmen S, Wongboot W, et al. Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. *Euro Surveill* 2020; 25(8):2000097. (5 pages).
10. Pastorino B, Touret F, Gilles M, de Lamballerie X, Charrel RN. Heat inactivation of different types of SARS-CoV-2 samples: What protocols for biosafety, molecular detection and serological diagnostics? *Viruses* 2020; 12(7): E735. (8 pages).
11. U.S. Food and Drug Administration. Policy for coronavirus disease-2019 tests during the public health emergency (revised): immediately in effect guidance for clinical laboratories, commercial

- manufacturers, and Food and Drug Administration staff. [online]. 2020; [cited 2020 Jul 14]; [20 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/policy-coronavirus-disease-2019-tests-during-public-health-emergency-revised>.
12. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Guidelines for the validation of qualitative real-time PCR methods by means of a collaborative study. [online]. 2016; [cited 2020 Jul 14]; [17 screens]. Available from: URL: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Guidelines%20for%20the%20validation%20of%20qualitative.pdf?__blob=publicationFile&v=3.
 13. Kim MN, Ko YJ, Seong MW, Kim JS, Shin BM, Sung H. Analytical and clinical validation of six commercial Middle East Respiratory Syndrome coronavirus RNA detection kits based on real-time reverse-transcription PCR. *Ann Lab Med* 2016; 36(5): 450-6.
 14. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* 2020; 20(4): 411-2.
 15. Rutledge RG, Stewart D. Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 96. (12 pages).
 16. Life Technologies Corporation. Real-time PCR handbook. [online]. 2012; [cited 2020 Jul 14]; [70 screens]. Available from: URL: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>.
-

Pre-marketing Evaluation of real-time RT PCR Test Kits for SARS-CoV-2 Detection: Thailand Emergency Use Authorization

Don Changsom¹ Siriphan Saeng-aroon¹ Thanutsapa Thanadachakul¹
Thitiphorn Hantragool¹ Sopita Kalong¹ Khanthiwa Chairad¹ Nanthawan Mekha¹
Pilailuk Akkapaiboon Okada¹ Noppavan Janejai¹ Malinee Chittaganpitch²
and Ballang Uppapong¹

¹National Institute of Health, ²Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT During the outbreak of SARS-CoV-2 in Thailand, molecular testing by real-time RT-PCR was crucial for diagnosis and disease surveillance. Several commercial PCR test kits for SARS-CoV-2 diagnosis were available. Pre-marketing evaluation for Emergency Use Authorization (EUA) of those test kits was necessary for marketing in the country. The process is consisted of reviewing a dossier including a package insert and performing laboratory evaluation. The laboratory was performed using a panel of 5 positive RNA samples derived from SARS-CoV-2 cultured cells for analytical sensitivity and 5 negative SARS-CoV-2 samples for analytical specificity. All samples were extracted and serially-diluted for target gene testing, *N*, *ORF1a/ab*, *E*, *RdRp* and *S*, according to each test kit. A total of 41 test kits were examined. Thirty-six test kits (88%) passed the evaluation. Three (7%) and two (5%) test kits failed for analytic sensitivity and analytic specificity as compared with the target sensitivity and specificity of 80% and 99.8%, respectively. Analysis on variability of a cycle threshold (Ct) retrieved from all testing found no difference for any target genes. It is, therefore, important for laboratory personnel to carefully consider details of each test kit prior to testing for achieving accurate results.

Keywords: SARS-CoV-2, real-time PCR, Test Kit Evaluation