

การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 ในประเทศไทย

อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์ วิโรจน์ พงษ์ทับทิม กฤษณ์ชัย จันทเพ็ชร วรางลักษณ์ พิมพากัย ทศนีย์ ไชยคำ
สุนิดา เสนาวรานนท์ ชญาดา ทองคำแสน จีรภา ศิลาเกษ คณิศร ลาภอดิศร สกฤษรัตน์ สุนทรนัฏราวัฒน์
และปณิดา เทพอัศธร

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 เพื่อขึ้นทะเบียนจำหน่ายในประเทศไทยนั้น ต้องผ่านมาตรฐานและการประเมินตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ซึ่งประกอบด้วย การประเมินความไวเชิงวินิจฉัย (Diagnostic sensitivity) ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 85 ความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (Diagnostic specificity) ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 98 และความไม่จำเพาะ (Non-specificity) หรือปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reactivity) ไม่เกินร้อยละ 10 การศึกษานี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่ประสงค์ขึ้นทะเบียนระหว่างวันที่ 30 เมษายน 2563 ถึง 24 มิถุนายน 2563 จากผู้ประกอบการชุดทดสอบจำนวน 21 ผลิตภัณฑ์ ด้วยชุดตัวอย่างมาตรฐานจำนวน 170 ตัวอย่าง ที่เตรียมโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผลการประเมินพบว่า มีความไวเชิงวินิจฉัยอยู่ในช่วง 94-100% ความจำเพาะเชิงวินิจฉัยอยู่ในช่วง 34-100% และความไม่จำเพาะอยู่ในช่วง 0-65% เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน พบว่าผ่านเกณฑ์จำนวน 15 ผลิตภัณฑ์ (71.4%) และไม่ผ่านเกณฑ์จำนวน 6 ผลิตภัณฑ์ (28.6%) ในกลุ่มที่ไม่ผ่านเกณฑ์พบว่ามีจำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ ให้ผล %specificity ต่ำกว่าเกณฑ์จำนวน 1 ผลิตภัณฑ์ มีอัตราของ %Cross reactivity สูง และจำนวน 1 ผลิตภัณฑ์ ไม่ผ่านเกณฑ์ทั้ง %specificity และ %sensitivity ผลที่ได้แสดงว่าการประเมินชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 ก่อนขึ้นทะเบียนจำหน่าย โดยใช้ชุดตัวอย่างมาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้มีความเหมาะสม ส่งผลให้มีชุดทดสอบที่มีคุณภาพสำหรับการใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข

คำสำคัญ ชุดทดสอบแอนติบอดี, SARS-CoV-2, การประเมินชุดทดสอบ

Corresponding author E-mail: archawin.r@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 25 August 2020

Accepted: 6 September 2020

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) หรือโควิด-19 เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2; SARS-CoV-2) เริ่มระบาดตั้งแต่ปลายปี 2562 และเมื่อวันที่ 11 มีนาคม 2563 องค์การอนามัยโลกประกาศให้เป็นโรคระบาดใหญ่ทั่วโลก (Pandemic) โดยเริ่มจากเมืองอู่ฮั่น สาธารณรัฐประชาชนจีน และแพร่ระบาดไปทั่วโลกจนถึงปัจจุบัน ในการตรวจหาการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ปัจจุบันใช้วิธี real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR) เป็นวิธีมาตรฐาน⁽¹⁾ สามารถตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มแรก เพราะเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของตัวเชื้อ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีศักยภาพและบุคลากรต้องได้รับการฝึกอบรม มีประสบการณ์ในการตรวจระดับชีวโมเลกุลเป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามมีการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจทางภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิคต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ เช่น Enzyme linked Immunoassay (ELISA), Chemiluminescence (CLIA) หรือเทคนิคที่ไม่ต้องใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ Immunochromatography ซึ่งเป็นการทดสอบอย่างง่าย มีการพัฒนาสำหรับการตรวจหาตัวเชื้อและภูมิคุ้มกันต่อตัวเชื้อ ใช้เวลาไม่เกิน 15-30 นาที ในการทดสอบ จึงเรียกชุดตรวจประเภทนี้ว่า Rapid test⁽²⁾ อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของการแปลผล และประสิทธิภาพของชุดทดสอบ ซึ่งจะต้องทำการประเมินผลให้ชัดเจนก่อนที่จะนำไปใช้ในภาคปฏิบัติสำหรับการตรวจวินิจฉัยในผู้สงสัยว่าติดเชื้อจริง เนื่องจากระบาดของ COVID-19 เป็นโรคอุบัติใหม่ที่ระบาดครั้งแรกในโลก ข้อมูลการศึกษาวินิจฉัยและการพัฒนาชุดทดสอบต่าง ๆ ยังคงมีจำกัด อย่างไรก็ตามมีผู้ผลิตจำนวนมากได้พัฒนาชุดทดสอบเพื่อใช้ในการตรวจหาภูมิคุ้มกัน เพื่อจำหน่ายไปยังประเทศที่มีการระบาดของไวรัสชนิดนี้

จากข้อมูลขององค์กร The Foundation for Innovative New Diagnostics (FINN) ที่ทำการรวบรวมข้อมูลของชุดทดสอบ และทำการศึกษาวินิจฉัยเพื่อประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบให้กับองค์การอนามัยโลก พบว่ามีบริษัทที่ผลิตชุดทดสอบชนิดตรวจภูมิคุ้มกัน (Rapid antibody test) ที่วางจำหน่ายแล้ว 257 บริษัท ชุดทดสอบสำหรับการตรวจหาตัวเชื้อ (Rapid antigen test) จำนวน 28 บริษัท และอยู่ในระหว่างการพัฒนาจำนวน 32 บริษัท (ข้อมูลวันที่ 8 มิถุนายน 2563)⁽³⁾ ซึ่งการควบคุมหรือประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบในช่วงที่ผ่านมายังไม่มีหน่วยงานหรือองค์กรใดกำหนดเกณฑ์เพื่อใช้พิจารณาอย่างเป็นทางการสำหรับการขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายชุดทดสอบของแต่ละประเทศ ทั้งนี้องค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ออกแนวทาง Emergency Used Authorization (EUA) ซึ่งระบุแนวทางสำหรับชุดทดสอบหาภูมิคุ้มกัน⁽⁴⁾ ประกอบด้วยข้อมูลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reactivity) ความจำเพาะ (Analytical specificity) การจำแนกประเภทของภูมิคุ้มกัน (Class specificity) และข้อมูลการศึกษาทางคลินิก (Clinical agreement study) แต่ไม่ได้กำหนดเกณฑ์เพื่อใช้ในการพิจารณาให้ชัดเจนแต่อย่างใด

ในประเทศไทยมีผู้ประกอบการแสดงความประสงค์ขออนุญาตนำเข้าชุดทดสอบเพื่อมาจำหน่ายเป็นจำนวนมาก สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ได้ประกาศให้มีการประเมินเทคโนโลยี และกำหนดเกณฑ์สำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ⁽⁵⁾ ประกอบด้วย ความไวเชิงวินิจฉัย (Diagnostic sensitivity) ความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (Diagnostic specificity) และความไม่จำเพาะ (Non-specificity) หรือปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reactivity) รวมทั้งประกาศให้มืองค์กรเชี่ยวชาญสามารถทำการประเมินชุดทดสอบ⁽⁶⁾ ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นผู้ดำเนินการจัดเตรียมชุดตัวอย่างมาตรฐาน สำหรับใช้ในการประเมินทางห้องปฏิบัติการ ร่วมกับเครือข่ายการตรวจประเมินชุดทดสอบในประเทศไทย ทำหน้าที่ประเมินชุดทดสอบที่จะขึ้นทะเบียนกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เพื่อจำหน่ายในประเทศต่อไป การศึกษาดังนี้เป็นการรวบรวมข้อมูลผลการประเมินชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดี SAR-CoV-2 ที่บริษัทผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าแจ้งความจำนงค์ขอขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายต่อสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ซึ่งมีการตรวจสอบข้อมูลเอกสาร และส่งตัวอย่างชุดทดสอบเพื่อทำการประเมินเทคโนโลยีทางห้องปฏิบัติการตามที่กำหนด

วัสดุและวิธีการ

ชุดตัวอย่างมาตรฐาน (Standard Panel Samples) สำหรับการประเมินชุดทดสอบ

ชุดตัวอย่างมาตรฐานสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงของประเทศไทย 1 ชุดตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัยจำนวน 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัยจำนวน 100 ตัวอย่าง และตัวอย่างประเมินความไม่จำเพาะจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งชุดตัวอย่างมาตรฐานที่ประกอบด้วย 170 ตัวอย่างของการทดสอบนี้ ได้รับอนุมัติการเจาะเลือดและใช้ตัวอย่างเลือดจากคณะกรรมการพิจารณาการวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ วันที่อนุมัติ 13 กรกฎาคม 2563 เลขที่ EC192/63 ตัวอย่างทั้งหมดถูกสุ่มให้รหัส และแจกจ่ายไปยังห้องปฏิบัติการตามที่ อย. กำหนด โดย 1 ชุดตัวอย่างมาตรฐานใช้กับ 1 รุ่นผลิตภัณฑ์/ชนิดผลิตภัณฑ์ ของชุดทดสอบ และนำมาจากผู้ประกอบการ มีรายละเอียด คือ

ตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัย (Diagnostic sensitivity)

เป็นตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่เตรียมมาจากเลือดของผู้ป่วยที่มีอาการ หรือเป็นผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ตามนิยาม (patient under investigation, PUI) ของโรค COVID-19 ที่ยืนยันผลการตรวจด้วย real-time RT-PCR จาก nasopharynx swab แล้วให้ผลบวก ที่มาเข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลที่ผู้ป่วยรักษาตัว เป็นตัวอย่างเลือด หรือซีรัม ที่ทำการขอรับบริจาคเพิ่มจากผู้ป่วย และทำการส่งตรวจยืนยันด้วยวิธี Neutralization test และ/หรือ Plaque reduction test และตรวจหาประเภทของแอนติบอดีโดยวิธี ELISA หรือ CLIA

ตัวอย่างประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (Diagnostic specificity)

เป็นตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่เตรียมมาจากเลือดของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ไม่มีอาการเจ็บป่วย ณ ช่วงเวลาที่เจาะเก็บเลือด ไม่มีประวัติเสี่ยง/ประวัติสัมผัส หรือเป็นผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ตามนิยาม Patient under investigation (PUI) ของโรค COVID-19 และส่งตรวจหาโรคร่วมอื่น ได้แก่ Hepatitis B surface antigen (HBsAg), Hepatitis B core antibody (anti-HBc), Venereal Disease Research Laboratory test (VDRL), Rheumatoid Factor (RF) และทดสอบหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโควิด-19 ด้วยวิธี ELISA IgM/IgG

ตัวอย่างประเมินความไม่จำเพาะ (Non-specificity or Cross reactivity)

เป็นตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่เตรียมมาจากเลือดของอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยในกลุ่มโรคติดเชื้อไวรัสที่อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับชุดทดสอบ COVID-19 ได้ เช่น ไวรัสไข้เลือดออก (Dengue), ไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza type A หรือ B), ไวรัสตับอักเสบ (Hepatitis B หรือ C) และกลุ่มผู้มีภาวะการสร้างภูมิตอบสนองไม่ปกติ เช่น ผู้ป่วย Systemic Lupus Erythematosus (SLE), ผู้ป่วย Rheumatoid Arthritis และผู้มีภาวะตั้งครบก เป็นต้น

ชุดทดสอบและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2

อย. ประสานงานให้ผู้ประกอบการที่ต้องการขอขึ้นรับการตรวจประเมินเทคโนโลยีให้จัดส่งชุดทดสอบ และน้ำยาไปยังห้องปฏิบัติการตามที่ อย. กำหนด จำนวน 200 ชุดทดสอบ ต่อ 1 รุ่นผลิตภัณฑ์ และต่อ 1 ชนิดผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีทั้งหมด 21 ผลิตภัณฑ์ สิ้นสุด ณ วันที่ 24 มิถุนายน พ.ศ. 2563

การตรวจสอบใบกำกับน้ำยาและกำหนดวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินชุดทดสอบ

อย. ดำเนินการแจ้งไปยังห้องปฏิบัติการที่เป็นผู้ประเมินชุดทดสอบ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นผู้จัดส่งชุดตัวอย่างมาตรฐานสำหรับการประเมินชุดทดสอบ และผู้ประกอบการจัดส่งชุดทดสอบให้กับห้องปฏิบัติการตามที่ อย.

กำหนด ประกอบด้วยห้องปฏิบัติการคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี และห้องปฏิบัติการสถาบันบำราศนราดูร ซึ่งห้องปฏิบัติการที่เป็นผู้ประเมินชุดทดสอบต้องศึกษาข้อมูลตามใบกำกับน้ำยาที่ได้แนบมาพร้อมกับชุดทดสอบ เพื่อกำหนดสถานะการจัดเก็บชุดทดสอบ ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ตรวจ รวมทั้งวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เครื่องมือที่ใช้ และข้อควรระวัง ทั้งนี้วิธีการประเมินชุดทดสอบและน้ำยาอ้างอิงตามใบกำกับน้ำยากำหนดไว้ และตกลงวิธีการปฏิบัติงานร่วมกับผู้ประกอบการ เพื่อรับทราบแนวทางปฏิบัติร่วมกัน

การประเมินชุดทดสอบและน้ำยาโดยใช้ชุดตัวอย่างมาตรฐาน

นำชุดทดสอบ/ชุดน้ำยาตรวจ COVID-19 จากตู้เก็บที่ควบคุมสถานะของแต่ละชุดทดสอบตามที่กำหนดไว้ มาทดสอบร่วมกับชุดตัวอย่างมาตรฐานสำหรับการประเมินชุดทดสอบจำนวน 170 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบตามวิธีการทดสอบ และต้องปฏิบัติตามคู่มือการใช้งานหรือเอกสารกำกับชุดตรวจ COVID-19 ของแต่ละผลิตภัณฑ์ ตามที่ได้กำหนด/ตกลงไว้กับผู้ประกอบการ การทดสอบทำในห้องปฏิบัติการระดับ 2 และให้ปฏิบัติตามหลักการความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ในการอ่านผลการทดสอบชุดตรวจ COVID-19 กำหนดให้เจ้าหน้าที่ที่ได้รับมอบหมาย 1 คน เป็นผู้อ่านปฏิกิริยาในครั้งแรก พร้อมทั้งถ่ายภาพปฏิกิริยาของชุดทดสอบเก็บไว้ จากนั้นเจ้าหน้าที่ที่ได้รับมอบหมายให้ร่วมอ่านผลปฏิกิริยาการทดสอบจำนวน 2 คน มาอ่านปฏิกิริยาในลำดับที่สอง และสามต่อไป โดยเป็นอิสระต่อกัน การอ่านผลการทดสอบจะสรุปผลเป็นผลบวกหรือผลลบ⁽⁷⁾ แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละ ความไว ความจำเพาะ และความไม่จำเพาะ (ปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม) โดยเปรียบเทียบผลระหว่างผลจากการทดสอบอ้างอิง (ผลจากชุดตัวอย่างมาตรฐาน) กับผลการทดสอบที่ได้จากชุดทดสอบ/ชุดน้ำยาในแต่ละรุ่นผลิตภัณฑ์ ดังนี้

		ผลการทดสอบอ้างอิง (ผลจากชุดตัวอย่างมาตรฐาน)		
		ผลบวก	ผลลบ	รวม
ผลการทดสอบที่ได้จากชุดทดสอบ/ชุดน้ำยา	ผลบวก	a	c	a + c
	ผลลบ	b	d	b + d
	รวม	a + b	c + d	a + b + c + d

โดยที่

ความไวเชิงวินิจฉัย (Diagnostic Sensitivity) คือ ชุดตรวจแสดงผลเป็นบวกเมื่อทดสอบกับตัวอย่างอ้างอิง ให้ผลเป็นบวก โดยคำนวณได้จาก

$$\% \text{sensitivity} = \{a/(a+b)\} \times 100$$

ความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (Diagnostic Specificity) คือ ชุดตรวจแสดงผลเป็นลบเมื่อทดสอบกับตัวอย่างอ้างอิง ให้ผลเป็นลบ โดยคำนวณได้จาก

$$\% \text{specificity} = \{d/(c+d)\} \times 100$$

ความไม่จำเพาะ (Non-specificity) หรือปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reactivity) คือ ชุดตรวจแสดงผลเป็นบวกเมื่อทดสอบกับตัวอย่างอ้างอิง ให้ผลเป็นลบ โดยกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่อาจเกิดปฏิกิริยากับชุดทดสอบ/ชุดน้ำยาได้

$$\% \text{cross reactivity} = (\text{ตัวอย่างที่ให้ผลบวก} / \text{ตัวอย่างที่อาจเกิดปฏิกิริยากับชุดทดสอบ/ชุดน้ำยา}) \times 100$$

การประเมินชุดทดสอบและน้ำยาโดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานของประเทศไทย (เกณฑ์มาตรฐาน อย. กำหนด)

เมื่อนำชุดทดสอบมาประเมินร่วมกับชุดตัวอย่างมาตรฐานแล้วให้นำผลมาเปรียบเทียบกับค่าคาดหวังจากกลุ่มตัวอย่าง และจัดทำรายงานผล โดยการคำนวณค่า %sensitivity, %specificity และ %cross reactivity โดยอ้างอิงตามเกณฑ์ที่ อย. กำหนดไว้⁽⁵⁾ ของชุดทดสอบแบบแอนติบอดี ดังนี้

ลำดับ	ข้อกำหนด	เกณฑ์การประเมิน
1.	ความไวเชิงวินิจฉัย (Diagnostic sensitivity)	$\geq 85\%$, $n \geq 50$
2.	ความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (Diagnostic specificity)	$\geq 98\%$, $n \geq 100$
3.	ความไม่จำเพาะ (non-specificity)	$\leq 10\%$, $n \geq 20$

ผล

รายละเอียดข้อมูลของชุดทดสอบ

ชุดทดสอบ และน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ส่งจาก อย. เพื่อขอให้ประเมินเทคโนโลยี ระหว่างวันที่ 30 เมษายน 2563 ถึง 24 มิถุนายน 2563 มีจำนวนชุดทดสอบทั้งสิ้น 21 ผลิตภัณฑ์ โดยชุดทดสอบร้อยละ 66.7 เป็นชุดตรวจแบบ rapid test และเป็นหลักการตรวจแบบ Immunochromatography ร้อยละ 66.7 มีชุดทดสอบไม่ระบุชนิดของโปรตีนแอนติเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบของชุดทดสอบจำนวนร้อยละ 76.2 และเป็นชุดทดสอบที่ผลิตจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนร้อยละ 38.1 ซึ่งส่วนใหญ่มีมาตรฐานการผลิต Conformance Europeenee (European conformity, CE) ร้อยละ 79.2 และจำนวนชุดทดสอบร้อยละ 81.0 ใช้ปริมาตรตัวอย่างทดสอบ 10-20 ไมโครลิตร ต่อ 1 การทดสอบ นอกจากนี้มีชุดทดสอบที่ไม่ระบุข้อมูล %sensitivity และ %specificity จำนวนร้อยละ 28.6 โดยชุดทดสอบ และน้ำยาที่มีข้อมูลจากใบกำกับน้ำยาพบว่า มีความไวในช่วง 86.4 - 100% โดยเปรียบเทียบผลกับตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจ real-time RT-PCR ใน nasal swab ที่มีผลเป็นบวกจากจำนวนศึกษา (n) ระหว่าง 40-361 ตัวอย่าง และมีความไวในช่วง 98.0-100% โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ให้ผล real-time RT-PCR ใน nasal swab ที่มีผลลบ จากจำนวนศึกษา (n) ระหว่าง 150-1,071 ตัวอย่าง นอกจากนี้เกินกว่าครึ่งไม่ระบุ %cross reactivity รายละเอียดคุณลักษณะทั่วไปของชุดทดสอบ ดังแสดงตารางที่ 1

การประเมินชุดทดสอบ และน้ำยาโดยใช้ชุดตัวอย่างมาตรฐาน

จากการตรวจทดสอบชุดทดสอบและน้ำยาร่วมกับชุดตัวอย่างมาตรฐานจำนวน 170 ตัวอย่าง ในแต่ละชุดทดสอบจำนวน 21 ผลิตภัณฑ์ พบว่าให้ผล %sensitivity ถูกต้องตรงกับชุดตัวอย่างมาตรฐานที่เป็นผลบวก (100% sensitivity) จำนวน 9 ผลิตภัณฑ์ ให้ผล %specificity ถูกต้องตรงกับชุดตัวอย่างมาตรฐานที่เป็นผลลบ (100% sensitivity) จำนวน 14 ผลิตภัณฑ์ และไม่เกิด cross reactivity (0% cross reactivity) จำนวน 11 ผลิตภัณฑ์ ผลการประเมินชุดน้ำยา ดังแสดงตารางที่ 2

ตารางที่ 1 รายละเอียดข้อมูลของชุดทดสอบและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ส่งจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เพื่อขอให้ประเมินเทคโนโลยีเครือข่ายห้องปฏิบัติการ ในการตรวจประเมินชุดทดสอบและน้ำยาจำนวน 21 ผลิตภัณฑ์ ระหว่างวันที่ 30 เมษายน 2563 ถึง 24 มิถุนายน 2563

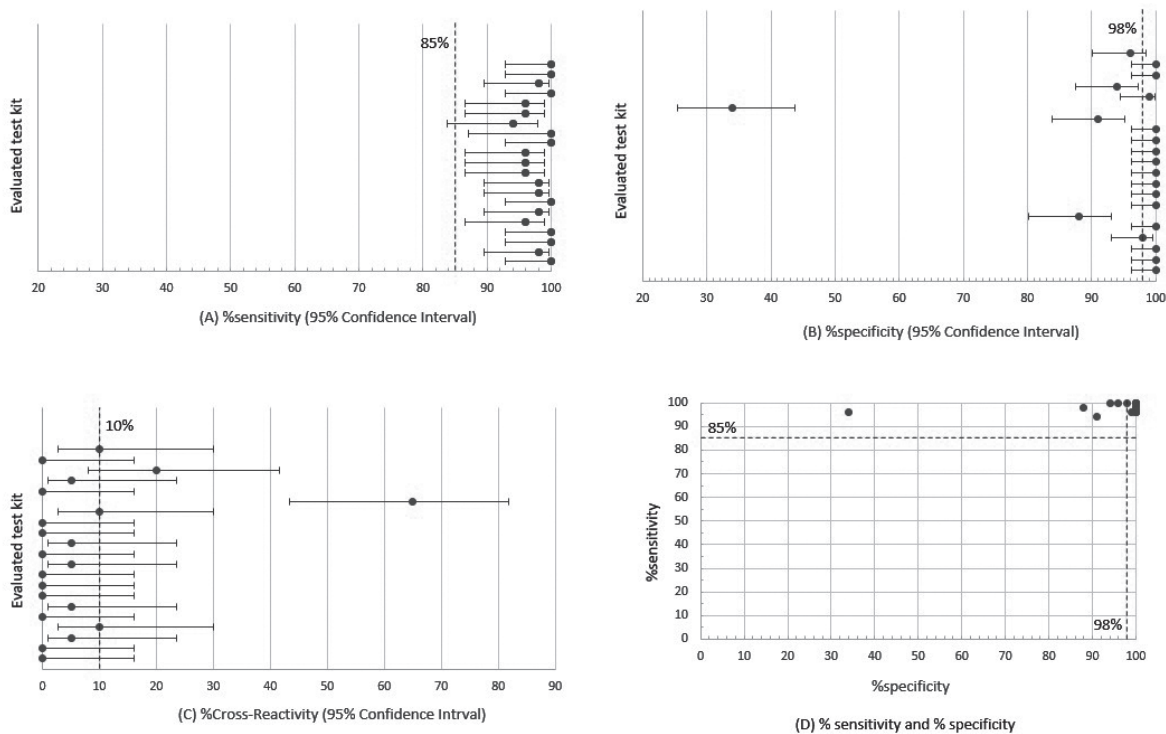
ลักษณะของชุดทดสอบที่ส่งให้ประเมิน (n=21)	จำนวน	ร้อยละ
ประเภทลักษณะชุดทดสอบ		
- Rapid test Assay	14	66.7
- Machine Base Assay	7	33.3
หลักการทดสอบ		
- Immunochromatography	14	66.7
- Chemiluminescence Immunoassay (CMIA)	5	23.8
- Electro Chemiluminescence Immunoassay (ECLIA)	2	9.5
องค์ประกอบแอนติเจนที่ใช้ในชุดทดสอบ		
- Recombinant Spike Protein (S1)	3	14.3
- Recombinant Nucleocapsid Protein (N)	2	9.5
- ไม่ระบุ	16	76.2
ประเทศผู้ผลิต		
- สาธารณรัฐประชาชนจีน	8	38.1
- สหรัฐอเมริกา	4	19.0
- อื่น ๆ (สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี สหราชอาณาจักร สหพันธรัฐสวิส สาธารณรัฐไอร์แลนด์ สาธารณรัฐสิงคโปร์ และไทย)	9	42.6
มาตรฐานการผลิต		
- CE mark	16	79.2
- ไม่ระบุ	5	23.8

ตารางที่ 2 ผลการประเมินชุดทดสอบและน้ำยาโดยใช้ชุดตัวอย่างมาตรฐาน

ประสิทธิภาพชุดทดสอบ/ชุดน้ำยา (ต่ำสุด – สูงสุด)	จำนวน (รุ่นผลิตภัณฑ์/ชนิดผลิตภัณฑ์)	ร้อยละ
%sensitivity (94% – 100%)		
- 100%	9	42.9
- 98%	5	23.8
- 96%	6	28.6
- 94%	1	4.8
%specificity (34% – 100%)		
- 100%	14	66.7
- 99%	1	4.8
- 98%	1	4.8
- ≤96%	5	23.8
%cross reactivity (0% – 65%)		
- 0%	11	52.4
- 5%	5	23.8
- 10%	3	14.3
- ≥20%	2	9.5

การประเมินชุดทดสอบและน้ำยาโดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน

จากผลตรวจประเมินชุดทดสอบและน้ำยาร่วมกับชุดตัวอย่างมาตรฐาน เมื่อพิจารณาใช้เกณฑ์มาตรฐานการขึ้นทะเบียนจาก อย. ตามที่กำหนด พบว่ามีจำนวน 15 ผลติภัณฑ์ จาก 21 ผลติภัณฑ์ (ร้อยละ 71.4) ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด โดยมี 6 ผลติภัณฑ์ ที่พบว่า 4 ผลติภัณฑ์ มีผล %specificity ต่ำกว่าเกณฑ์ มี 1 ผลติภัณฑ์ ให้ผล %cross reactivity ไม่ผ่าน และมี 1 ผลติภัณฑ์ ที่มีผลทั้ง %specificity และ %sensitivity ไม่ผ่านเกณฑ์ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงค่า %sensitivity, %specificity และ %cross reactivity ของชุดทดสอบและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ส่งจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เพื่อขอให้ประเมินเทคโนโลยีเครือข่ายห้องปฏิบัติการในการตรวจประเมินชุดทดสอบและน้ำยาจำนวน 21 รุ่นผลติภัณฑ์/ชนิดผลติภัณฑ์ ระหว่างวันที่ 30 เมษายน 2563 ถึง 24 มิถุนายน 2563

- (A) ผลประเมิน %sensitivity แสดงผลโดยรวมของชุดทดสอบและน้ำยา เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนดจาก อย.
- (B) ผลประเมิน %specificity แสดงผลโดยรวมของชุดทดสอบและน้ำยา เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนดจาก อย.
- (C) ผลประเมิน %cross reactivity แสดงผลโดยรวมของชุดทดสอบและน้ำยา เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนดจาก อย.
- (D) ผลประเมินเมื่อพิจารณาร่วมระหว่าง %sensitivity และ %specificity

วิจารณ์

การประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดี SARS-CoV-2 เพื่อให้ได้มาตรฐานนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ปฏิบัติตามขั้นตอนสอดคล้องกับ Policy for Coronavirus Disease-2019 Tests During the Public Health Emergency (Revised) ของ EUA โดยมีความแตกต่างเล็กน้อย คือตัวอย่าง cross reactivity ในโรคที่กำหนดใน EUA บางโรคไม่สามารถหาตัวอย่างได้ เช่น Alpha coronavirus และ Beta coronavirus และในเรื่องจำนวนกลุ่มตัวอย่าง ซึ่ง EUA กำหนดให้ใช้กลุ่มตัวอย่าง positive อย่างต่ำ 30 ตัวอย่าง และ negative อย่างต่ำ 75 ตัวอย่าง⁽⁴⁾ ขณะที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้เตรียมกลุ่มตัวอย่างผู้ติดเชื้อ COVID-19 จำนวน 50 ตัวอย่าง กลุ่มตัวอย่างจากคนปกติ 100 ตัวอย่าง⁽⁵⁾

นอกจากนี้องค์กร The Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND)⁽⁸⁾ ซึ่งทำการศึกษาวิจัยเพื่อประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบในห้องปฏิบัติการอนามัยโลก ได้กำหนดเกณฑ์ของตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจากประชากรกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อจำนวน 300 ราย และกลุ่มผู้ติดเชื้ออย่างน้อย 100 ราย ซึ่งในจำนวนนี้ประกอบด้วยกลุ่มย่อยดังนี้ ผู้ติดเชื้อหลังมีอาการ 0-3 วัน จำนวน 10 ราย, กลุ่มผู้ป่วยหลังมีอาการ 4-7 วัน จำนวน 20 ราย, กลุ่มผู้ป่วยหลังมีอาการ 8-14 วัน จำนวน 30 ราย, กลุ่มผู้ป่วยหลังมีอาการ 15-287 วัน จำนวน 20 ราย, กลุ่มผู้ป่วยหลังมีอาการมากกว่า 29 วัน จำนวน 20 ราย ทั้งนี้การเตรียมตัวอย่างมาตรฐานจากผู้ป่วยในประเทศที่มีการระบาดรุนแรง สามารถรวบรวม และดำเนินการได้ อย่างไรก็ตามองค์กรดังกล่าวไม่ได้เตรียมตัวอย่างเพื่อจำหน่าย รวมทั้งยังไม่มีเผยแพร่ผลการประเมินแต่อย่างใด แต่สำหรับประเทศไทย มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อในประเทศต่ำ⁽⁹⁾ ผู้ป่วยกระจายตามโรงพยาบาลต่างๆ ทั่วประเทศ ข้อมูลความเสี่ยงของการได้รับเชื้อไม่สามารถระบุได้ชัดเจน ทำให้ไม่สามารถจำแนกตัวอย่างในลักษณะของการติดเชื้อระยะเริ่มแรก ระยะกลาง หรือระยะช่วงหลังของการติดเชื้อ ทั้งนี้ตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ในการประเมินครั้งนี้เลือกใช้เกณฑ์จากผลการทดสอบปริมาณของแอนติบอดีจากวิธี Plaque Reduction Neutralization assay (PRNT) รวมทั้งการทดสอบด้วยวิธี ELISA และ CLIA เพื่อจำแนกชนิดของแอนติบอดี โดยที่การคำนวณค่าความไวเชิงวินิจฉัยดำเนินการจากผลการทดสอบที่แสดงผลบวกรวม ไม่จำแนกเป็นชนิด IgM หรือ IgG

ในการประเมินชุดทดสอบครั้งนี้ มีชุดทดสอบที่ต้องวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติจำนวน 7 ผลิตภัณฑ์ ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมินทั้งหมด ในขณะที่ชุดทดสอบที่อ่านผลด้วยตาเปล่า ผ่านเกณฑ์การประเมินเพียง 8 ผลิตภัณฑ์ จากทั้งหมด 14 ผลิตภัณฑ์ ซึ่งสาเหตุที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินเป็นผลมาจากการทดสอบหาความจำเพาะเชิงวินิจฉัยที่ทดสอบในกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อ SAR CoV-2 ให้ผลบวกปลอม (False positive) เกินเกณฑ์มาตรฐานของ อย. ซึ่งชุดทดสอบให้ผลบวกปลอมสูงอาจส่งผลให้ค่าความไวของชุดทดสอบสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้ข้อมูลจากผู้ประกอบการส่วนใหญ่ไม่ได้ระบุถึงชนิดหรือประเภทของการเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในชุดทดสอบ และบางชุดของการทดสอบเป็นแอนติบอดีรวม ไม่ได้จำแนกประเภท ดังนั้นผู้ใช้ทดสอบนี้จำเป็นต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ของการใช้ตรวจร่วมด้วย

สำหรับชุดทดสอบ Rapid test ตามหลักการ Lateral flow เป็นวิธีการตรวจอย่างง่าย อ่านผลปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าอาจเกิดความผิดพลาดจากการอ่านผลได้โดยง่าย ดังนั้นในการอ่านผลจึงจำเป็นต้องใช้ผู้มีคุณสมบัติทางวุฒิการศึกษา เช่น นักเทคนิคการแพทย์ หรือนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 3 ท่าน ฝึกการอ่านปฏิกิริยา และให้คะแนนตามคำแนะนำของ World Health Organization (WHO) ตัวอย่างเช่น การประเมินชุดตรวจการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Performance Evaluation of HBsAg serology assays)⁽⁷⁾ การอ่านผลต้องเป็นอิสระต่อกัน เมื่ออ่านผลเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงจะมีการเปิดเผยผลของตัวอย่างนั้นๆ รูปแบบดังกล่าวดำเนินการภายใต้การควบคุมของผู้ควบคุมคุณภาพทุกขั้นตอน รวมทั้งการควบคุมเวลาในการอ่านผลของผู้อ่านผลทั้ง 3 คน ให้อยู่ภายในเงื่อนไขของเอกสารกำกับชุดตรวจแต่ละชนิด ซึ่งถือเป็นการดำเนินงานอย่างเป็นระบบ สามารถให้การยอมรับในผลการประเมินอย่างมีประสิทธิภาพได้

อย่างไรก็ตามในการประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องอย่างแท้จริง ควรทดสอบจากการปฏิบัติในภาคสนาม (Field study) ซึ่งจะมีประชากรจำนวนมาก และมีความหลากหลายในลักษณะของประชากร การสรุปผลการตรวจวินิจฉัยสามารถทำได้ร่วมกับวิธีการทดสอบมาตรฐานอื่นๆ รวมทั้งใช้ข้อมูลอาการทางคลินิก ระยะเวลาที่เสี่ยงต่อการได้รับเชื้อ หรือระยะเวลาการดำเนินของโรค รวมทั้งประวัติการติดเชื้อโรคร่วมอื่นๆ ของผู้ป่วยแต่ละราย อีกทั้งภูมิคุ้มกันที่ตรวจพบจากชุดทดสอบนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าภูมิคุ้มกัน (Protective antibody) สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้หรือไม่ ควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

สรุป

จากการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีทางน้ำเหลืองวิทยาของเชื้อ SARS-CoV-2 (เชื้อก่อโรค COVID-19) โดยการใช้ชุดตัวอย่างมาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีความน่าเชื่อถือ และได้รับการยอมรับจากสำนักงานอาหารและยา มีระบบการประเมินที่มีประสิทธิภาพ ทำให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขและเครือข่ายห้องปฏิบัติการ สามารถบริการตรวจวิเคราะห์ประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ COVID-19 ชนิดตรวจหาแอนติบอดี เพื่อผู้ประกอบการสามารถนำไปใช้ประกอบการขึ้นทะเบียนก่อนวางจำหน่ายให้กับห้องปฏิบัติการต่างๆ ในประเทศไทย อย่างไรก็ตามสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ควรมีระบบกำกับติดตามหลังการจำหน่ายอย่างเข้มงวด รวมทั้งอนุญาตให้ใช้ชุดทดสอบโดยบุคลากรทางการแพทย์เท่านั้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเครือข่ายห้องปฏิบัติการประเมินชุดตรวจหาแอนติบอดีทางน้ำเหลืองวิทยาของเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งประกอบด้วย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันบำราศนราดูร ขอขอบคุณโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขผ่านสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ สถาบันชีววัตถุ และที่ให้การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ทุนสนับสนุน และผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้คำปรึกษาตลอดจนเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยทางคลินิก และผู้ร่วมงานทุกท่าน ที่ให้ความคิดเห็น และความร่วมมือทำให้งานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. [online]. 2020; [cited 2020 Aug 5]; [10 screens]. Available from: URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf>.
2. Gronvall G, Connell N, Kobokovich A, West R, Warmbrod KL, Shearer MP, et al. Developing a national strategy for serology (antibody testing) in the United States. Baltimore, MD: John Hopkins University; 2020.
3. The Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). SARS-CoV-2 diagnostic pipeline. [online]. 2020; [cited 2020 Aug 5]; [40 screens]. Available from: URL: <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline>.

4. 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, issued on the web on May 4, 2020. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2020.
5. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดมาตรฐานและการประเมินชุดตรวจและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (เชื้อก่อโรค COVID-19) พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 103 ง (ลงวันที่ 1 พฤษภาคม 2563). หน้า 23.
6. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง รายชื่อผู้เชี่ยวชาญ องค์การผู้เชี่ยวชาญ หน่วยงานของรัฐ หรือหน่วยงานอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ประเมินชุดตรวจและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (เชื้อก่อโรค COVID-19) พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 103 ง (ลงวันที่ 1 พฤษภาคม 2563). หน้า 24.
7. World Health Organization. WHO protocol for performance laboratory evaluation of HBsAg serology assays. [online]. 2017; [cited 2020 Aug 5]; [16 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/alter/171219_protocol_pqdx_108_v8_hbsag.pdf.
8. The Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). Comparative evaluation of lateral flow assay (LFA) and ELISA tests that detect human antibodies specific to SARS-CoV-2 to support COVID-19 case management. [online]. 2020; [cited 2020 Aug 5]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2020/04/20200427-COVID-19-IA-Evaluation-Synopsis.pdf>.
9. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. รายงาน COVID-19 ประจำวัน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 5 สิงหาคม 2563]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://data.go.th/dataset/covid-19-daily>.

Performance Evaluation of SARS-CoV-2 Antibody Test Kits in Thailand

Archawin Rojanawiwat Wiroj Puangtabtim Kritchai Juntaped Warangluk Pimpapai Tassanee Chaiyakum Suwanida Senawaranon Chayada Tongkamsen Jeerapa Srilaket Kanidsorn Larpardisorn Sakulrat Soonthornchartrawat and Panadda Dhepakson

Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Performance evaluation of SARS-CoV-2 antibody test kits is required by Thai Food and Drug Administration (Thai FDA). The criteria of regulations include diagnostic sensitivity (not less than 85%), diagnostic specificity (not less than 98%) and non-specific or cross reactivity (not over than 10%). This study was aimed to assess performance of SARS-CoV-2 antibody test kits prior to registration approval by Thai FDA. During 30th April – 24th June 2020, a total of 21 products were subjected for performance evaluation using the standard panel samples prepared by the Department of Medical Sciences (DMSc). The panel was consisted of 170 samples. The evaluation results of all test kits revealed that diagnostic sensitivity and diagnostic specificity were ranged from 94-100%, and 34-100%, respectively. In addition, cross reactivity was varied from 0-65%. According to the acceptance criteria, 15 products were passed (71.4%) while six products (28.6%) were failed. The evaluation demonstrated that lower range of diagnostic specificity and higher rate of cross reactivity were found in four and one products, respectively. In addition, performance of one product did not pass both diagnostic specificity and sensitivity criteria. Our study suggested that pre-marketing evaluation of SARS-CoV-2 antibody test kits using the DMSc standard panel samples was well-established for registration approval, resulting in availability of qualified test kits for use in clinical and public health laboratories.

Keywords: Antibody test kit, SARS-CoV-2, kit evaluation