
การเตรียมชุดตัวอย่างสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรกระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงของประเทศไทย

วิโรจน์ พวงทับทิม กฤษณ์ชัย จันทเพ็ชร วรางลักษณ์ พิมพ์ภักย์ ทศนีย์ ไชยคำ สุวนิดา เสนาวรานนท์ ชญาดา ทองคำแสน จีรภา ศิลาเกษ คณิศร ลากอดิศร สกุลรัตน์ สุนทรฉัตรวัฒน์ ปันตดา เทพอัศร์ และอาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรกระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (SARS-CoV-2) มีความสำคัญในการช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อในกรณีวิธี real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) ให้ผลลบ และการศึกษาระบาดวิทยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศไทย ได้ประกาศมาตรฐานและการประเมินชุดทดสอบที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคโควิด-19 เพื่อขึ้นทะเบียนจำหน่าย จึงได้พัฒนาชุดตัวอย่างเพื่อใช้ประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีขึ้น ได้แก่ ชุดตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) ชุดตัวอย่างประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity) และชุดตัวอย่างประเมินความไม่จำเพาะ (non-specificity/cross reactivity) จากตัวอย่างเลือดอาสาสมัครจำนวน 100 105 และ 37 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างที่มีคุณลักษณะเฉพาะครบตามข้อกำหนดจำนวน 51 (ร้อยละ 51: 95% CI = 40.9-61.1) 105 (ร้อยละ 100: 95% CI = 95.6-100) และ 32 (ร้อยละ 86.5: 95% CI = 70.4-94.9) ตัวอย่าง สำหรับประเมินคุณภาพชุดทดสอบแอนติบอดีต่อโรคโควิด-19 ทางห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีความพร้อมดำเนินการตรวจประเมินคุณภาพชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2

คำสำคัญ : ตัวอย่างประเมินชุดทดสอบ, การตรวจแอนติบอดี, ไวรัสโคโรนา 2019, โควิด-19

Corresponding author E- mail: wiroj.p@dmsc.mail.go.th

Received: 13 June 2020

Revised: 25 August 2020

Accepted: 6 September 2020

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) หรือโควิด-19 เกิดจากการติดเชื้อไวรัสกลุ่มโคโรนาชื่อ Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) มีการระบาดตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2562 และวันที่ 11 มี.ค. 2563 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศให้เป็นโรคระบาดใหญ่ (pandemic) ทั่วโลก⁽¹⁾ ซึ่งการตรวจหาการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ในปัจจุบัน ใช้วิธี real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) ตรวจในตัวอย่างชนิด nasopharyngeal swab เป็นวิธีมาตรฐาน สามารถตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มแรก เพราะเป็นการตรวจหาห้วงพันธุกรรมของตัวเชื้อ⁽²⁾ แต่มีข้อจำกัดที่ต้องทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งจะมีเฉพาะที่หน่วยบริการที่มีศักยภาพ และบุคลากรต้องได้รับการฝึกอบรม มีประสบการณ์ในการตรวจระดับชีวโมเลกุลเป็นอย่างดี ได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น วิธีการตรวจแบบ immuno-chromatography สำหรับการตรวจหาเชื้อ/โปรตีน/ส่วนประกอบของตัวเชื้อ (แอนติเจน) และภูมิตอบสนองต่อเชื้อที่ร่างกายของผู้ติดเชื้อสร้างขึ้น (แอนติบอดี)

วิธีการตรวจโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันพัฒนาขึ้นเพื่อรองรับการใช้งานแบบให้บริการ ณ จุดตรวจ (point-of-care testing) ที่ต้องการความรวดเร็ว (ไม่เกิน 15-30 นาที) เนื่องจากเป็นวิธีการที่ตรวจง่าย ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ในการทดสอบ ใช้เวลาตรวจสั้น เรียกชุดตรวจประเภทนี้เป็น rapid test⁽³⁾ แต่ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของการแปลผล และประสิทธิภาพของชุดทดสอบ ซึ่งจะต้องทำการประเมินผลให้ชัดเจนก่อนที่จะนำไปใช้ในภาคปฏิบัติสำหรับการตรวจวินิจฉัยในผู้สงสัยว่าติดเชื้อจริง การตรวจหาแอนติเจน หรือแอนติบอดีด้วยวิธีการตรวจแบบชุดตรวจประเภท rapid test ไม่เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อ SARS-CoV-2 เพื่อการดูแลรักษา และบริหารจัดการผู้ป่วย แต่การตรวจหาแอนติบอดีแบบ rapid test มีประโยชน์ในด้านช่วยประกอบการวินิจฉัยที่สรุปผลไม่ได้ เช่น กรณีผู้ป่วย Patient Under Investigate (PUI) ที่มีผล RT-PCR เป็นลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่มาพบแพทย์ล่าช้า และเป็นวิธีการสำคัญในการศึกษาวิจัยแบบย้อนหลังทางระบาดวิทยา (retrospective epidemiology)⁽⁴⁾ ดังนั้นการใช้ชุดตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ต้องคำนึงถึงคุณภาพของชุดตรวจตั้งแต่ประสิทธิภาพของการทดสอบจนถึงการแปลผล ซึ่งจะต้องทำการประเมินผลให้ชัดเจนก่อนที่จะนำไปใช้ในภาคปฏิบัติสำหรับการตรวจวินิจฉัยในประชากรจริง

ในประเทศไทย กองควบคุมเครื่องมือแพทย์ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) มีหน้าที่ประเมินเทคโนโลยีเครื่องมือแพทย์ ชุดตรวจและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 โดยรับคำขอประเมินและออกไปรับรองการประเมินชุดตรวจและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ให้กับบริษัทที่นำเข้าสู่ตลาดจากต่างประเทศหรือผลิตเองภายในประเทศโดยจะต้องได้รับการประเมินทางห้องปฏิบัติการโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือห้องปฏิบัติการที่ได้รับมอบหมายตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข⁽⁵⁾

นอกเหนือจากการประเมินเอกสารประกอบเพื่อพิจารณาประสิทธิภาพ ความน่าเชื่อถือของข้อมูล และมาตรฐานการผลิตของชุดทดสอบแล้ว ต้องมีการประเมินทางห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบประสิทธิภาพ^(6, 7) กับตัวอย่างมาตรฐานที่สามารถระบุความสามารถของชุดทดสอบได้ตรงกับอาการทางคลินิก และการติดเชื้อจริงตามเกณฑ์กำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เพื่อให้ประชาชน/ผู้ใช้ชุดทดสอบที่ผ่านการประเมินคุณภาพทางห้องปฏิบัติการและได้รับอนุญาตการจำหน่ายได้ในประเทศนั้นจะได้รับผลการตรวจที่มีความถูกต้อง ไม่เกิดความเสียหายจากการใช้งานชุดตรวจนี้ การประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ COVID-19 แบบตรวจหาแอนติบอดี (antibody) จึงต้องใช้กลุ่มตัวอย่างของอาสาสมัครเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดตามเกณฑ์การทดสอบของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 อย่างน้อย 100 ราย กลุ่มตัวอย่างผู้มีสุขภาพดีไม่ติดเชื้อ SARS-CoV-2 อย่างน้อย 200 ราย และกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยสำหรับทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มอย่างน้อย 100 ราย จากผู้ป่วย เช่น Dengue, Influenza type A หรือ B, Hepatitis B หรือ C, Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus (SLE), หญิงตั้งครรภ์ และผู้มีโรคประจำตัวอื่น ๆ เป็นต้น

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในฐานะหน่วยงานที่เป็นหน่วยงานของรัฐ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่มีความสามารถเป็นผู้ประเมินชุดตรวจและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (เชื้อก่อโรค COVID-19)⁽⁵⁾ จึงจำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพชุดทดสอบ การศึกษานี้เป็นการจัดหาตัวอย่างเพื่อใช้ประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบ โดยต้องผ่านการตรวจด้านคุณลักษณะเฉพาะ ต้องมีข้อมูลอาการทางคลินิกประกอบด้วย เพื่อให้เป็นตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก เพื่อยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่จะนำมาใช้ และต้องจัดให้ครอบคลุมครบถ้วนทั้งประเภท จำนวน และปริมาตรของตัวอย่าง เพื่อรองรับการให้บริการตรวจประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจโควิดของแต่ละบริษัทที่ได้นำมาขึ้นทะเบียนกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

วัตถุประสงค์และวิธีการ

กลุ่มประชากรที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างเพื่อคัดเลือกเป็นวัตถุทดสอบ (sample panel) สำหรับประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ ได้จากประชากรไทย เพศชายหรือเพศหญิง อายุตั้งแต่ 18 ปี ขึ้นไป โดยแบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม ดังนี้

ตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity)

เป็นตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่เตรียมมาจากเลือดของผู้ป่วยที่มีอาการหรือเป็นผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ตามนิยาม PUI ของโรค COVID-19 ที่ยืนยันผลการตรวจด้วย real-time RT-PCR จาก nasopharynx swab แล้วให้ผลบวก ที่มาเข้าการรักษา ณ โรงพยาบาลที่ผู้ป่วยรักษาตัว ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดหรือซีรัมที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการประจำวันของโรงพยาบาลนั้น ๆ จำนวน 100 ราย

ตัวอย่างประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity)

เป็นตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่เตรียมมาจากเลือดของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ไม่มีอาการเจ็บป่วย ณ ช่วงเวลาที่เจาะเก็บเลือด ไม่มีประวัติเสี่ยง/ประวัติสัมผัส หรือเป็นผู้ป่วยที่ผู้เข้าเกณฑ์ตามนิยาม (patient under investigation, PUI) ของโรค COVID-19 จำนวน 105 ราย

ตัวอย่างประเมินความไม่จำเพาะ (non-specificity/cross reactivity)

เป็นตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่เตรียมมาจากเลือดของอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยในกลุ่มโรคติดเชื้อไวรัสที่อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับชุดทดสอบ SARS-CoV-2 (COVID-19) ได้ เช่น ไวรัสไข้เลือดออก Dengue, ไวรัสไข้หวัดใหญ่ Influenza type A หรือ B, ไวรัสตับอักเสบ Hepatitis B หรือ C และกลุ่มผู้มีภาวะการสร้างภูมิตอบสนองไม่ปกติ เช่น ผู้ป่วย SLE, ผู้ป่วย Rheumatoid Arthritis และภาวะตั้งครกร์ เป็นต้น จำนวน 37 ราย

การสำรวจข้อมูลและวางแผนการเก็บตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัย สํารวจหน่วยงาน/โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ที่ตั้งอยู่ในจังหวัดใกล้เคียงกับที่ตั้งของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เช่น โรงพยาบาลในจังหวัดนนทบุรี นครปฐม สมุทรปราการ สมุทรสงคราม และชลบุรี เพื่อทราบจำนวนผู้ติดเชื้อที่เข้ารับบริการ ดำเนินการประสานงานกับเจ้าหน้าที่หน่วยงาน เพื่อติดต่อกลุ่มผู้ป่วยเป้าหมาย และชี้แจงแนวทางการดำเนินงาน เช่น การอธิบายชี้แจงโครงการ การคัดเลือกอาสาสมัคร/ตัวอย่าง การขอความยินยอมการให้ข้อมูล การเจาะเก็บเลือด การเก็บรักษาตัวอย่างและการขนส่ง กรณีกลุ่มตัวอย่างประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย และกลุ่มตัวอย่างประเมินความไม่จำเพาะ เป็นกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี

และกลุ่มผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ที่มีข้อมูลอยู่แล้ว ณ ศูนย์วิจัยทางคลินิก สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ คำนวณจำนวนตัวอย่างโดยใช้สูตรการหาจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง⁽⁶⁾ ดังนี้

$$n = N/(1+Ne^2)$$

โดยที่ n = จำนวนตัวอย่างที่ต้องสุ่มมาใช้ในการศึกษา

N = จำนวนตัวอย่างที่มีทั้งหมด

e = ระดับความคาดเคลื่อนในการสุ่มตัวอย่างที่ยอมรับ (การศึกษานี้กำหนดที่ 5%)

การขออนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน เพื่อเจาะเลือดและใช้ตัวอย่างเลือด

ขออนุมัติโครงการเพื่อเจาะเลือด และใช้ตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างวัตถุทดสอบ (sample panel) สำหรับประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อก่อโรค COVID-19 จากอาสาสมัคร 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ติดเชื้อ/ผู้ป่วยโรค COVID-19 อาสาสมัครในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มโรคติดเชื้อไวรัสที่อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับชุดทดสอบ COVID-19 และในกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี โดยได้รับการอนุมัติการเจาะเลือดและใช้ตัวอย่างเลือดจากคณะกรรมการพิจารณาการวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ วันที่อนุมัติ 13 กรกฎาคม 2563 เลขที่ EC192/63

การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้เป็นวัตถุทดสอบ

ตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัย ให้เก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรค COVID-19 ที่เหลือจากการตรวจตรวจวิเคราะห์จากงานประจำจากห้องปฏิบัติการ เป็นตัวอย่างชนิดเลือดแข็งตัว (clot blood) หรือเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง EDTA ปริมาณอย่างน้อย 10 มิลลิลิตร อาจเป็นตัวอย่างที่มีการติดตามทุก ๆ 0-7 วัน 8-14 วัน และ 15 วันขึ้นไป หลังจากแสดง ตัวอย่างเลือดถูกนำมาปั่นแยกซีรัม/พลาสมาที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ระยะเวลา 10 นาที จากนั้นแบ่งตัวอย่างใส่ในหลอดพลาสติกชนิดทนความเย็นหลอดละ 500 ไมโครลิตร เก็บในสภาวะต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจวิเคราะห์หาคุณสมบัติเฉพาะของตัวอย่าง และจัดเป็นชุดตัวอย่างเพื่อใช้ประเมินชุดน้ำยาตรวจต่อไป

ตัวอย่างประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย และตัวอย่างประเมินความไม่จำเพาะ ได้จากการคัดกรองอาสาสมัครที่ศูนย์วิจัยทางคลินิก สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครอายุ 18 ปีขึ้นไป ตามกระบวนการวิจัยทางคลินิกที่ดี โดยอาสาสมัครแต่ละรายถูกเจาะเก็บเลือดจำนวน 30 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นแยกซีรัม/พลาสมาที่ความเร็วรอบ และระยะเวลา และแบ่งตัวอย่างและเก็บเช่นเดียวกันกับกลุ่มตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัย

การพิสูจน์ลักษณะเฉพาะของตัวอย่าง

ตัวอย่างซีรัม/พลาสมาที่เตรียมเพื่อเป็นวัตถุทดสอบ (Sample panel) สำหรับประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ นำมาพิสูจน์ลักษณะเฉพาะของตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่มีผลบวกแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 (โรค COVID-19) ตรวจโดยวิธี neutralizing antibody assay (NT) โดยเทคนิค plaque reduction neutralization test (PRNT) ที่สถาบันชีววัตถุ และตรวจแยกชนิด Immunoglobulin (Ig) ชนิด IgG และ IgM ด้วยวิธี in-house enzyme link immuno sorbent assay (ELISA) ที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ และ chemiluminescence (MAGLUMI, Snibe, Shenzhen, China) โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในชุดตัวอย่างบวกนี้ใช้เกณฑ์ค่า PRNT titer ≥ 100 มีผลบวกทั้งวิธี ELISA และ chemiluminescence มีข้อมูลทางคลินิก เช่น เป็นผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ตามนิยาม PUI ของโรค COVID-19 และมีผลการตรวจ real-time RT-PCR เป็นบวกจาก nasopharyngeal swab ร่วมด้วย

ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่มีผลลบต่อแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ตรวจโดยใช้วิธี in-house ELISA และตรวจหาการติดเชื้ออื่น ๆ เช่น Hepatitis B virus surface Antigen (HBsAg) วิธี sandwich ELISA (Elecsys® HBsAg II quant II, Roche, Mannheim, Germany), Hepatitis C virus Antibody (Anti-HCV) วิธี sandwich ELISA (Elecsys® Anti-HCV II, Roche, Mannheim, Germany), Venereal Diseases Research Laboratory test (VDRL) วิธี flocculation (VDRL carbon Antigen, Biotec, Dorset, United Kingdom), และ Rheumatoid Factor (RF) วิธี latex agglutination (RF sero, Dialab, Neudorf, Austria) โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในชุดตัวอย่างฉบับนี้ใช้เกณฑ์ผลการตรวจเป็นลบในทุกรายการทดสอบดังกล่าว และไม่มีประวัติการเจ็บป่วย ณ ช่วงเวลาที่เจาะเก็บเลือด ไม่มีประวัติเสี่ยง/ประวัติสัมผัส หรือเป็นผู้ป่วยที่ผู้เข้าเกณฑ์ตามนิยาม PUI ของโรค COVID-19

ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับชุดทดสอบแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 เป็นตัวอย่างอาสาสมัครที่มีประวัติการเป็นโรคหรือหายจากโรคที่อาจมีแอนติบอดีที่อาจเกิดผลบวกปลอม เพื่อใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความไม่จำเพาะ (non-specificity/cross reactivity) เช่น อาสาสมัครที่เคยเป็นไข้หวัดใหญ่ Influenza A, B ตรวจแอนติบอดีวิธี immunochromatography (Alere BinaxNOW® Influenza A&B, Abbott, California, USA) อาสาสมัครที่เคยเป็นไข้เลือดออก Dengue ตรวจแอนติบอดีวิธี immunochromatography (BIOLINE Dengue IgG/IgM, Standard Diagnostics, Kyonggi-do, South Korea) อาสาสมัครมีประวัติติดเชื้อตับอักเสบบี Hepatitis B, C วิธี sandwich ELISA (Elecsys® HBsAg II quant II และ Anti-HCV II, Roche, Mannheim, Germany), อาสาสมัครเป็น SLE ตรวจแอนติบอดีด้วยการหา Anti-Nucleated Antibody (ANA) วิธี latex agglutination (SLE sero, Dialab, Neudorf, Austria) อาสาสมัครเป็น Rheumatoid Arthritis ตรวจแอนติบอดี Rheumatoid Factor (RF) วิธี latex agglutination (RF sero, Dialab, Neudorf, Austria) และอาสาสมัครหญิงตั้งครรภ์ยืนยันภาวะตั้งครรภ์ด้วย urine pregnancy test วิธี immunochromatography (BIOLINE hCG, Standard Diagnostics, Kyonggi-do, South Korea) ตัวอย่างที่นำมาใช้ในชุดตัวอย่างที่อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับชุดทดสอบ ใช้เกณฑ์ผลการตรวจเป็นบวกในทุกรายการทดสอบตามโรคประจำตัวของอาสาสมัคร และต้องผลแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี ELISA เป็นลบ

การจัดเตรียมชุดตัวอย่าง และการจัดการข้อมูล

ทำการกำหนดรหัสตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อมีผลการตรวจเป็นไปตามข้อกำหนดของในแต่ละกลุ่มแบบสุ่ม โดยในแต่ละชุดของตัวอย่าง panel sample ประกอบด้วยจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 170 ตัวอย่าง ต่อชุด panel ต้องมีตัวอย่างสำหรับการประเมินความไวของชุดทดสอบจำนวน 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างประเมินความจำเพาะ 100 ตัวอย่าง และตัวอย่างสำหรับการประเมินความไม่จำเพาะ 20 ตัวอย่าง ตามประกาศ อย. (9) ข้อมูลทั้งหมดถูกเก็บในแบบบันทึกการจัดชุดตัวอย่างและข้อมูลของตัวอย่างทดสอบ และถูกสุ่มหมายเลขชุดรหัสไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่ทำหน้าที่ประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2

ผล

ข้อมูลตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการประเมินความไวเชิงวินิจฉัย จากการสอบถามไปยังผู้ประสานงานในแต่ละแห่งของหน่วยพยาบาล พบว่าในระหว่างเดือนมีนาคม ถึงมิถุนายน 2563 มีจำนวนผู้ป่วยที่มา รักษาตัวในโรงพยาบาลและมีผลการยืนยันการติดเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 133 คน และเมื่อนำมาสุ่มตัวอย่างเพื่อขอเก็บตัวอย่างนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่ความผิดพลาด 5% โดยใช้สูตรของทาโร ยามาเนะ (8) ได้สุ่มตัวอย่าง

จำนวน 100 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ถูกเจาะหลังมีอาการทางคลินิก ตั้งแต่ 0 (หมายถึงมีอาการแล้วเจาะเลือดเลย) ถึง 33 วัน (มัธยฐาน 12 วัน) แบ่งกลุ่มการเจาะเลือดได้เป็น 0-7 วัน 8-14 วัน และมากกว่า 15 วัน และไม่มีข้อมูลจำนวน 25 19 27 และ 29 ตัวอย่าง ตามลำดับ

กลุ่มตัวอย่างผู้มีสุขภาพดีที่นำมาใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย ได้คัดกรองอาสาสมัครทั้งหมด 142 ราย โดยใช้ข้อมูลที่มีอยู่ ณ ศูนย์วิจัยทางคลินิก สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ สุ่มอาสาสมัครจำนวน 105 ราย เพื่อเจาะเลือดนำไปตรวจคัดกรอง HBsAg, Anti-HCV, VDRL, Rheumatoid Factor (RF) และแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2

กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยสำหรับทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม มีข้อมูลอาสาสมัครทั้งหมด 37 ราย ที่ตรงกับโรค/อาการป่วยที่ต้องการนำมาใช้ในชุดตัวอย่าง ซึ่งมีกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการ/มีประวัติการติดเชื้อ ได้แก่ ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก Dengue จำนวน 5 ราย ไวรัสไข้หวัดใหญ่ Influenza A หรือ B จำนวน 5 ราย ไวรัสตับอักเสบ hepatitis B หรือ C จำนวน 7 ราย เป็น Rheumatoid Arthritis จำนวน 10 ราย เป็น SLE จำนวน 5 ราย และ เป็นหญิงตั้งครรภ์ จำนวน 5 ราย

จำนวนตัวอย่าง/อาสาสมัครที่มีข้อมูลทั้งหมด และจำนวนที่สุ่มคัดเลือกเข้ามาใช้ในการเตรียมตัวอย่างประเมินชุดน้ำยา/ชุดทดสอบ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่าง/อาสาสมัครที่นำเข้ามาตรวจคุณสมบัติเฉพาะ (Laboratory testing) เพื่อใช้เป็นชุดตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง	ตัวอย่างที่มีอยู่ในฐานข้อมูล	ตัวอย่างที่นำมาตรวจคุณสมบัติ
ตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัย (diagnostic sensitivity)	133	100 วันที่เจาะเลือดหลังมีอาการ มัธยฐาน = 12 วัน) - 0-7 วัน (n= 25) - 8-14 วัน (n= 19) - มากกว่า 15 วัน (n=27) - ไม่มีข้อมูล (n= 29)
ตัวอย่างประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (diagnostic specificity)	142	105
ตัวอย่างประเมินความไม่จำเพาะ (non-specificity/cross reactivity)	37	37
- ไวรัสไข้เลือดออก Dengue	5	5
- ไวรัสไข้หวัดใหญ่ Influenza A B	5	5
- ไวรัสตับอักเสบ hepatitis B C	7	7
- Rheumatoid Arthritis	10	10
- SLE	5	5
- ตั้งครรภ์	5	5

ผลการพิสูจน์ลักษณะเฉพาะของตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยจำนวน 100 ตัวอย่าง ทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ตามนิยาม (patient under investigation, PUI) ของโรค COVID-19 และมีผล RT-PCR เป็นบวก เมื่อนำไปตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโควิด-19 วิธี neutralizing antibody โดยหา PRNT titer พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 62 ตัวอย่างที่มีระดับ PRNT titer มากกว่า 100 แต่เมื่อนำผลการตรวจ Total IgG/IgM ด้วยเทคนิค chemiluminescence

และ ELISA โดยใช้ผลการตรวจที่สอดคล้องกันทั้ง 3 วิธีมารวมด้วย จะเหลือตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นตัวอย่างทดสอบความไวเชิงวินิจฉัย สำหรับประเมินชุดน้ำยาได้จำนวน 51 ตัวอย่าง (ร้อยละ 51) รายละเอียดความสอดคล้องของการทดสอบหาแอนติบอดีและจำนวนตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของตัวอย่างผู้ป่วย COVID-19 เพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างการประเมินความไวเชิงวินิจฉัยของชุดทดสอบ/น้ำยาตรวจเพื่อหาแอนติบอดี

PRNT titer (n= 100)	Total IgG/IgM chemiluminescence	Total IgG/IgM ELISA	จำนวน (ตัวอย่าง)
< 100 (n=38)	negative	negative	21
	negative	positive	5
	positive	negative	3
	positive	positive	9
100-400 (n=25)	negative	negative	8
	positive	positive	17*
401-800 (n=11)	negative	positive	3
	positive	positive	9*
>800 (n=26)	negative	negative	1
	positive	positive	25*

*หมายเหตุ: ตัวอย่างที่มีค่าระดับ PRNT titer มากกว่า 100 และมีผล Total IgG/IgM เทคนิค chemiluminescence และ ELISA ให้ผลตรวจสอดคล้องกันทั้ง 3 วิธี

กลุ่มตัวอย่างสำหรับประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย ใช้อาสาสมัครในฐานข้อมูลการศึกษาชีวสมมูลของยาที่มีอยู่ของศูนย์วิจัยทางคลินิก สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติเสี่ยงต่อโรค COVID-19 จากการสุ่มคัดเลือกอาสาสมัครทั้งหมด 105 ราย และส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหา HBsAg, Anti-HCV, VDRL และ RF และทดสอบหาภูมิคุ้มกัน Total IgG/IgM ต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี ELISA จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างซีรัมทั้ง 105 ตัวอย่าง พบว่าทั้ง 105 ตัวอย่าง มีผลการตรวจเป็นลบทุกรายการทดสอบ

กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยสำหรับทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม เลือกอาสาสมัครที่มีประวัติการป่วยที่เข้ากันได้กับโรคที่อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยากับชุดทดสอบได้ทั้งหมด 37 ราย จากอาสาสมัคร ตรวจหาภูมิคุ้มกัน Total IgG/IgM ต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี ELISA เป็นลบทั้งหมด ตรวจยืนยันกลุ่มโรคด้วยวิธีการตรวจหาภูมิทางน้ำเหลืองวิทยาที่จำเพาะต่อกลุ่มโรคทางห้องปฏิบัติการ พบว่ามีผลบวกต่อกลุ่มโรคที่สอดคล้องกับประวัติทางคลินิกจริงจำนวน 32 ราย ได้แก่ ไวรัสไข้เลือดออก Dengue ไวรัสไข้หวัดใหญ่ Influenza A/B SLE ตั้งครรภ์ แต่มีกลุ่มไวรัสตับอักเสบ hepatitis B/C และ Rheumatoid Arthritis ที่ให้ผลการตรวจไม่สอดคล้องกับอาการทางคลินิกจำนวน 2 และ 3 ราย ตามลำดับ จำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้เป็นตัวอย่างเป็นการประเมินปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของชุดทดสอบหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 และเกณฑ์การนำตัวอย่างมาใช้ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคุณสมบัติเฉพาะของตัวอย่างเพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างการประเมินความไม่จำเพาะของชุดทดสอบ/น้ำยาตรวจเพื่อหาแอนติบอดี

ตัวอย่างประเมินความไม่จำเพาะ (non-specificity/cross reactivity)	จำนวนตัวอย่าง ที่นำมาตรวจคัดกรอง	เกณฑ์การนำตัวอย่างมาเป็น ตัวอย่างประเมิน	จำนวนตัวอย่าง ที่ผ่านเกณฑ์
- ไวรัสไข้เลือดออก Dengue	5	ELISA index ของ Dengue IgG > 1.1 ร่วมกับประวัติทางคลินิก	5
- ไวรัสไข้หวัดใหญ่ Influenza A B	5	HI Test Influenza A/B \geq 1:40 ร่วมกับประวัติทางคลินิก	5
- ไวรัสตับอักเสบ hepatitis B C	7	ELISA index ของ HBsAg, HCV-Ab > 1.1 ร่วมกับประวัติทางคลินิก	5
- Rheumatoid Arthritis	10	RF > 8 IU/mL ร่วมกับประวัติทางคลินิก	7
- SLE	5	ANA = positive ร่วมกับประวัติทางคลินิก	5
- ตั้งครรภ์	5	Urine pregnancy test = positive ร่วมกับประวัติทางคลินิก	5
รวม	37		32

วิจารณ์

การแพร่ระบาดของไวรัสโคโรนา 2019 (เชื้อก่อโรค COVID-19) เป็นโรคใหม่ที่ประเทศไทยเพิ่งประสบปัญหาเช่นเดียวกับทั่วโลก สำหรับประเทศไทยแนวทางการตรวจเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อใช้แนวทางเช่นเดียวกับองค์การอนามัยโรคแนะนำ แต่อย่างไรก็ตามได้มีการนำชุดตรวจหาแอนติบอดีแบบ rapid test มาใช้ร่วมด้วย ซึ่งแนวทางการใช้งาน และการประเมินชุดตรวจ ณ เวลานั้นยังไม่ชัดเจน การค้นหาตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาจัดทำเป็นตัวอย่างทดสอบมาตรฐานสำหรับประเมินชุดทดสอบเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนการผลิต/การนำเข้าเพื่อจำหน่ายในประเทศ ยังไม่มีการจัดเตรียมเพื่อรองรับระบบการประเมินขึ้น เนื่องจากประเทศไทยมีอุบัติการณ์ติดเชื้อในประเทศค่อนข้างต่ำ⁽¹⁰⁾ ทำให้การค้นหาผู้ติดเชื้อ และการเข้าเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษานั้นดำเนินการได้ยาก ซึ่งต้องปฏิบัติตามหลักการป้องกันและการกระจายแพร่เชื้อ (universal precaution) นอกจากนี้ผู้ติดเชื้อยังกระจายอยู่ในหลายพื้นที่ของประเทศ ส่งผลให้ต้องใช้เวลานานในการรวบรวมตัวอย่าง/อาสาสมัครเพื่อให้เพียงพอ และครบตามเกณฑ์ตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนด⁽⁹⁾

การทดสอบเพื่อระบุว่าตัวอย่างมีแอนติบอดีต่อโรค COVID-19 ใช้วิธี NT หรือวิธี PRNT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) และสามารถหาปริมาณหรือระดับของภูมิคุ้มกัน (antibody titer) ว่ามีมากน้อยเพียงใด แต่วิธีนี้ไม่สามารถจำแนกชนิดของแอนติบอดีที่ตรวจพบได้ ทำให้ต้องมีการตรวจด้วยวิธี ELISA หรือ chemiluminescence ที่สามารถตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีเป็น IgM หรือ IgG ซึ่งทางกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ดำเนินการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นเอง และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธี chemiluminescence (MAGLUMI, Snibe, Shenzhen, China) ที่ดำเนินการตรวจวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลรามาริบัติ อย่างไรก็ตามการคัดเลือกชุดตัวอย่างเพื่อใช้ในการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบน้ำเหลืองวิทยาของ SARS-CoV-2 ต้องมีผลบวกจากวิธี NT/PRNT ในทุกตัวอย่าง และมีผลบวกจากวิธี ELISA อาจเป็น IgG หรือ IgM ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการทั้ง 2 แห่ง โดยตัวอย่างในกลุ่มนี้ถูกนำไปใช้

สำหรับการประเมินความไวเชิงวินิจฉัยของชุดทดสอบ นอกจากนี้การเตรียมตัวอย่างผู้ป่วยของกลุ่มนี้มีความคาดหวังว่าผู้ป่วยในระยะติดเชื้อแรกเริ่ม (1-7 วัน) ระยะกลาง (8-14 วัน) และระยะท้ายหรือหายจากอาการ (>15 วัน) มีการสร้างชนิดแอนติบอดี และระดับภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน แต่การศึกษานี้ไม่สามารถจำแนกระยะเวลาที่ติดเชื้อที่แท้จริงได้ เนื่องจากผู้ป่วยบางรายไม่สามารถบ่งบอกระยะเวลาที่แน่นอน อาการต่างๆ มีความหลากหลาย หรือบางรายไม่ปรากฏอาการแต่อย่างใด เนื่องจากเป็นผู้สัมผัสผู้ติดเชื้อ (contact cases) ทำให้จำเป็นต้องแบ่งกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ระดับปริมาณภูมิคุ้มกันจากผลของระดับ NT/PRNT แล้วแบ่งเป็นกลุ่ม Low (PRNT titer 100-400), Medium (PRNT titer 401-800) และ High titer (PRNT titer >800) สำหรับประกอบในชุดประเมินเพื่อให้เกิดความหลากหลายของตัวอย่างกลุ่มประเมินความไวเชิงวินิจฉัย และเนื่องจากมีบางตัวอย่างที่มีผล PRNT ที่ titer ปานกลางถึงสูง ที่ให้ผลขัดแย้งกับผลการตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีแบบชนิด IgM หรือ IgG ด้วยวิธี ELISA หรือ chemiluminescence อาจเกิดจากแอนติบอดีชนิด IgA ได้ ซึ่งต้องดำเนินการตรวจแยกชนิดเพิ่มเติมต่อไป

การศึกษานี้ได้เตรียมชุดตัวอย่างเพื่อหาความจำเพาะเชิงวินิจฉัยจากกลุ่มผู้ไม่เป็นโรค COVID-19 ซึ่งทั้งหมดเป็นอาสาสมัครสุขภาพดี ได้รับการตรวจคัดกรองผลเลือดต่าง ๆ ได้แก่ HBsAg, Anti-HCV, VDRL และ RF เป็นลบทั้งหมด แต่ทั้งนี้พบว่าผลการตรวจ anti-HBs จำนวน 11 ราย ให้ผลบวก ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการได้รับวัคซีนไวรัสตับอักเสบบี หรือเคยสัมผัสเชื้อมาก่อนแต่ร่างกายสามารถกำจัดเชื้อมีให้หมดไปได้ และสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมา อย่างไรก็ตามสามารถจัดให้เป็นกลุ่มอาสาสมัครปกติได้ โดยทุกรายได้นำไปตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 เพื่อให้แน่ใจได้ว่าไม่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อน

การเตรียมชุดตัวอย่างเพื่อประเมินความไวเชิงวินิจฉัยของการตรวจหาแอนติบอดี หากใช้วิธี NT ที่ PRNT titer มากกว่า 100 ร่วมกับการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา ร่วมด้วยอีก 2 เทคนิควิธี เป็นวิธีประกอบการตัดสินใจเพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างประเมินความไวได้เพียงร้อยละ 51 ในขณะที่ตัวอย่างที่จะนำมาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อประเมินความจำเพาะเชิงวินิจฉัย และความไม่จำเพาะหรือการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม จะสามารถนำตัวอย่างมาใช้ในชุดประเมินได้สูงกว่า (ที่ร้อยละ 100 และร้อยละ 87 ตามลำดับ) ดังนั้นการหาตัวอย่างเพื่อประเมินความไวเชิงวิเคราะห์สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีควรเพื่อจำนวนตัวอย่างเพิ่มเติมจากเป้าหมายการเตรียมตัวอย่างไว้อย่างน้อย 1 เท่าของจำนวนตัวอย่างที่คัดเข้ามาตรวจคุณสมบัติเฉพาะทางห้องปฏิบัติการ

ส่วนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มนั้น มีความใกล้เคียงหรือสอดคล้องตามที่องค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (US-FDA) ประกาศใช้เมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม 2563⁽¹¹⁾ ซึ่งระบุให้มีการทดสอบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อต่าง ๆ ได้แก่ anti-influenza A (IgG and IgM), anti-influenza B (IgG and IgM), anti-HCV (IgG and IgM), anti-HBV (IgG and IgM), anti-Hemophilus influenzae (IgG and IgM), anti-229E (alpha coronavirus), anti-NL63 (alpha coronavirus), anti-OC43 (beta coronavirus) และ anti-HKU1 (beta coronavirus) แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์อื่นไม่ว่าจะเป็น Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) หรือ Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS) ที่เคยระบาดก่อนหน้านี้ไม่สามารถเตรียมตัวอย่างจากกลุ่มนี้ได้เนื่องจากพบผู้ป่วยในประเทศไทยน้อยมาก⁽¹⁰⁾

เนื่องจากการจัดเตรียมชุดตัวอย่างเพื่อใช้สำหรับการประเมินชุดทดสอบในช่วงแรกการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอและทันต่อการใช้งาน การตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบ (homogeneity) และความคงตัวของตัวอย่าง (stability) จึงเป็นการสุ่มตรวจสอบเบื้องต้น พบว่าเมื่อสุ่มมาตรวจสอบด้วยชุด rapid test ที่เคยมีผลการประเมินผ่านมาก่อนแล้วยังให้ผลการทดสอบที่เหมือนเดิมที่ร้อยละ 100 (3/3) และยังคงให้ผลตรงกับค่าคาดหวังจากการทดสอบที่ระยะเวลามากกว่า 3 สัปดาห์ ซึ่งการเก็บตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบเพื่อหาแอนติบอดีเชิงปริมาณสามารถเก็บในระยะเวลานาน⁽¹²⁾ นอกจากนี้ระบบการบันทึกข้อมูลทั้งหมด

ถูกเก็บในแบบบันทึกการจัดชุดตัวอย่างและข้อมูลของตัวอย่างทดสอบ กระบวนการจัดทำชุดตัวอย่างสำหรับประเมินชุดน้ำยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จัดทำขึ้นให้เป็นมาตรฐานเพื่อสร้างความมั่นใจในการใช้ชุดตัวอย่างที่จะถูกจัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่ทำหน้าที่ประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบหาแอนติบอดีของโรค COVID-19 เพื่อสรุปผลการประเมินตามพารามิเตอร์ต่างๆ ที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้กำหนดไว้

สรุป

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ดำเนินการเตรียมชุดตัวอย่างเพื่อประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ SARS-CoV-2 แบบหาแอนติบอดีที่มีกลุ่มตัวอย่างสำหรับทดสอบความไว ความจำเพาะ ความไม่จำเพาะหรือปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม และจำนวนตัวอย่างครบถ้วนเพียงพอ ตามเกณฑ์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนด สามารถให้บริการในการตรวจชุดทดสอบจากการผลิตภายในประเทศ หรือนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อนำผลการประเมินไปขอขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยได้ อย่างไรก็ตามการประเมินเทคโนโลยีของชุดทดสอบหาแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (เชื้อก่อโรค COVID-19) ต้องดำเนินการทดสอบโดยผู้ประเมินที่มีความชำนาญ มีมาตรฐานการปฏิบัติงาน และเป็นผู้เชี่ยวชาญ องค์กรผู้เชี่ยวชาญ หน่วยงานของรัฐ หรือหน่วยงานอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ประเมินชุดตรวจและน้ำยา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ผ่านสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ สถาบันชีววัตถุ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ทุนสนับสนุน และผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยทางคลินิก และผู้ร่วมงานทุกท่าน ที่ให้ความคิดเห็นและความร่วมมือทำให้งานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) emergency committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). [online]. 2020; [cite 2020 May 4]; [6 screens]. Available from: URL: [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)).
2. World Health Organization. Laboratory testing of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance, 17 January 2020. Geneva: World Health Organization; 2020.
3. Gronvall G, Connell N, Farley JE, Inglesby T, Jennings JM, Mehta SH, et al. Developing a national strategy for SARS-CoV-2 serosurveys in the United States. Baltimore, MD: Johns Hopkins Center for Health Security; 2020.

4. Infectious Diseases Society of America (IDSA). IDSA COVID-19 antibody testing primer. [online]. 2020; [cite 2020 May 4]; [3 screens]. Available from: URL: <https://www.idsociety.org/globalassets/idsa/public-health/covid-19/idsa-covid-19-antibody-testing-primer.pdf>.
5. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง รายชื่อผู้เชี่ยวชาญ องค์กรผู้เชี่ยวชาญ หน่วยงานของรัฐ หรือหน่วยงานอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ประเมินชุดตรวจและน้ำยาเกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (เชื้อก่อโรค COVID-19). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 103 ง (วันที่ 1 พฤษภาคม 2563). หน้า 24.
6. พระราชบัญญัติเครื่องมือแพทย์ พ.ศ. 2551 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เครื่องมือแพทย์ที่ต้องมีการประเมินเทคโนโลยี. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 98 ง (วันที่ 28 เมษายน 2563). หน้า 24.
7. พระราชบัญญัติเครื่องมือแพทย์ พ.ศ. 2551 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานของเครื่องมือแพทย์ที่ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าต้องปฏิบัติ พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 98 ง (วันที่ 28 เมษายน 2563). หน้า 23.
8. Yamane T. Elementary sampling theory. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1967.
9. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดมาตรฐานและการประเมินชุดตรวจและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (เชื้อก่อโรค COVID-19) พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 103 ง (วันที่ 1 พฤษภาคม 2563). หน้า 23.
10. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. [online]. 2020; [cite 2020 Jul 20]; [21 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>.
11. U.S. Food and Drug Administration. Policy for coronavirus disease-2019 tests during the public health emergency (revised). Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2020.
12. Chinese Center for Disease Control and Prevention. Technical guideline for COVID-19 laboratory testing. China CDC Weekly. [serial online]. 2020; [cite 2020 Jul 20]; X(X): [6 screens]. Available from: URL: <https://www.chinadaily.com.cn/pdf/2020/Technical.Guidelines.for.COVID-19.Laboratory.Testing.pdf>.

Preparation of Panel Samples to Evaluate Antibody Test Kits for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2019 in Thailand

Wiroj Puangtabtim Kritchai Juntaped Walangluk Pimpapai Tassanee Chaiyakum Suwanida Senawaranon Chayada Tongkamsen Jeerapa Srilaket Kanisorn Larpardisorn Sakulrat Soonthornchartrawat Panadda Dhepakson and Archawin Rojanawiwat
Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Antibody detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is important for supporting diagnosis when real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) is negative, and for epidemiological studies. Prior to marketing in Thailand, all anti-SARS-CoV-2 test kits must be met the criteria and approved by Thai Food and Drug Administration (Thai FDA). Panel samples for pre-marketing evaluation, were, therefore, prepared and characterized, including samples for determination of diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, and non-specific or cross reactivity samples that were obtained from 100, 105 and 37 volunteer subjects, respectively. In accordance with the specifications, there were 51 (51%: 95% CI=40.9-61.1) 105 (100%: 95% CI = 95.6-100) and 32 (86.5%: 95% CI=70.4-94.9) sera/plasma, respectively, suitable for use as the panel samples. This study indicated that preparedness for laboratory performance evaluation of test kits for antibody to SARS-CoV-2 has been established in Thailand.

Keywords: test kit evaluation samples, antibody testing, coronavirus 2019, COVID-19