ว กรมวิทย พ 2563; 62 (3) : 243-251

การทดสอบความชำนาญเพื่อขึ้นทะเบียนห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจวินิจฉัย SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR

สุนทรียา วัยเจริญ[1] พิไลลักษณ์ อัคคไพบูลย์ โอกาดะ[1] สิริพรรณ แสงอรุณ[1] คำแพว บัวใหญ่[1] สิริชล กาละ[1] ดนตร์ ช่างสม[1] ขันธ์ทิวา ชัยราช[1] รัตน์ระวี บุญเมือง[1] นันทวรรณ เมฆา[1] มาลินี จิตตกานต์พิชย์[2] และบัลลังก์ อุปพงษ์[1]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข [2]สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวินิจฉัยผู้สงสัยติดเชื้อ SARS-CoV-2 ทางห้องปฏิบัติการมีความสำคัญอย่างเร่งด่วนเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของโรคโควิด-19 ให้มีประสิทธิภาพ การทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการก่อนเปิดบริการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR เป็นหนึ่งข้อกำหนดเพื่อขอขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการเครือข่ายของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้จัดทำแผนทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR โดยจัดเตรียมชุดวัตถุทดสอบซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างลบจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างบวกจำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งมีไวรัสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จัดส่งให้ห้องปฏิบัติการจำนวน 166 แห่ง ในระหว่างวันที่ 31 มกราคม – 25 พฤษภาคม 2563 พบว่า ห้องปฏิบัติการ 164 แห่ง (ร้อยละ 98.8) รายงานผลถูกต้อง ขณะที่ห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง (ร้อยละ 1.2) ควรปรับปรุง นอกจากนี้จากค่า cycle threshold แสดงให้เห็นว่าการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ที่ยีนเป้าหมาย *E* มีความไวสูงกว่ายีน *N, ORF* และ *RdRp* การทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการก่อนเปิดบริการนี้ให้ความเชื่อมั่นทั้งด้านเทคนิคและความสามารถของห้องปฏิบัติการต่อผู้รับบริการ ดังนั้นห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัย SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR ควรเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญอย่างสม่ำเสมอ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของการทดสอบตลอดระยะเวลาการให้บริการ

คำสำคัญ การทดสอบความชำนาญ, real-time PCR, SARS-CoV-2

Corresponding author E-mail: sunthareeya.w@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020 *Revised: 24 July 2020* *Accepted: 6 August 2020*

บทนำ

การระบาดของโรคโควิด-19 เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ ชื่อว่า Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 หรือ SARS-CoV-2 พบว่าผู้ติดเชื้อจากไวรัสนี้ อาจจะไม่มีอาการจนถึงมีอาการรุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้ องค์การอนามัยโลก ตั้งชื่อโรคนี้ว่า "โควิด-19" (COVID-19) การแพร่ระบาดส่งผลกระทบทั่วโลกถึง 188 ประเทศ ซึ่งในเดือนกรกฎาคม 2563 มีผู้ติดเชื้อมากกว่า 14 ล้านคนแล้ว องค์การอนามัยโลกได้แนะนำวิธี real-time PCR สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง[1, 2] ขั้นตอนการทดสอบคือ ใช้ชุดน้ำยาสกัดยีโนมของไวรัสซึ่งเป็นชนิด RNA จากตัวอย่างผู้ป่วย จากนั้นสังเคราะห์ RNA เป็น cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase เพิ่มจำนวน DNA ส่วนที่ต้องการตรวจสอบด้วยน้ำยาที่มี polymerase Tag enzyme, primers และ probes ที่จำเพาะกับไวรัส SARS-CoV-2 และติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติ (real-time PCR) ทำอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA และตรวจวัด DNA ของไวรัสที่เพิ่มขึ้น ผ่านระบบ detection unit วัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ แสดงออกมาเป็นรูปกราฟหรือตัวเลขความเข้มของแสงในแต่ละรอบของปฏิกิริยา สามารถอ่านผลเป็นปริมาณไวรัส หรือพบ/ไม่พบไวรัส

การรองรับสถานการณ์ กรณีโรคปอดอักเสบจากเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้ยกระดับศูนย์ปฏิบัติการภาวะฉุกเฉินเป็นระดับกระทรวงสาธารณสุข เพื่อติดตามสถานการณ์โรคทั้งในประเทศและต่างประเทศอย่างใกล้ชิด และเสริมสร้างความเข้มแข็งของระบบการเฝ้าระวังค้นหาผู้ป่วยกรณีโรคปอดอักเสบจากเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) โดยการทำงานแบบบูรณาการทุกกระทรวงรวมทั้งประสานงานกับองค์การอนามัยโลก และประเทศในอาเซียน เพื่อการดำเนินการอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยมาตรฐานระดับสูงสุดในการป้องกันควบคุมโรคติดต่อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้รับมอบหมายจากกระทรวงสาธารณสุขให้วางแผนพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลทุกจังหวัดให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้ ภายใต้นโยบาย 1 แล็บ 1 จังหวัด 100 ห้องปฏิบัติการ[3]

ห้องปฏิบัติการที่จะเปิดบริการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time นอกจากต้องเตรียมความพร้อมด้านโครงสร้าง ความปลอดภัย ระบบคุณภาพ และการรายงานผลแล้ว ยังจำเป็นต้องเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญที่จัดโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ก่อนเปิดบริการ[4] เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำต่อการตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อเพื่อให้ทันต่อการรักษาผู้ป่วยและการควบคุมโรค การศึกษานี้เป็นการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการสำหรับขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อการตรวจวินิจฉัยโควิด-19 ด้วยวิธี real-time PCR

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมชุดวัตถุทดสอบ

ตัวอย่างวัตถุทดสอบผลลบ เตรียมจากเซลล์ HEp-2 (Human epithelial type 2, ATCC®CCL-23™) โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ใช้ 0.05% Trypsin-EDTA แยกเซลล์ออกให้เป็นเซลล์เดี่ยว นำมาเจือจางใน Viral Transport Medium และใช้เซลล์ HEp-2 ที่เตรียมนี้สำหรับเจือจางตัวอย่างวัตถุทดสอบผลบวกต่อไป

ตัวอย่างวัตถุทดสอบผลบวกเตรียมจากเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยรหัส nCoV-19/Thailand/74/2020 (Accession ID:EPI_ISL_403963) ซึ่งตรวจลำดับพันธุกรรมของไวรัสแล้วพบว่ามีความเหมือนกับสายพันธุ์ nCoV-19/Wuhan/IPBCAMSWH-01/2019 (Accession ID:EPI_ISL_402123) ร้อยละ 100 โดยนำไปเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cells, ATCC®CCL-81™) เจือจางไวรัสที่ช่วงความเข้มข้น $1:10^3$ - $1:10^6$ ในเซลล์ HEp-2 ที่เตรียมขึ้น

ชุดวัตถุทดสอบมีจำนวน 5 ตัวอย่างปริมาตรหลอดละ 500 ไมโครลิตร ประกอบด้วยตัวอย่างที่ให้ผลบวก 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างผลลบ 1 ตัวอย่าง มีการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำมาจัดชุดวัตถุทดสอบ แล้วจึงจัดส่งให้ห้องปฏิบัติการที่ประสงค์เปิดบริการทั่วประเทศ โดยขนส่งในกล่องโฟมบรรจุด้วยน้ำแข็งแห้ง พร้อมคู่มือแนะนำในการตรวจวิเคราะห์รายละเอียดของวัตถุทดสอบแสดงในตารางที่ 1

สมาชิกห้องปฏิบัติการ

สมาชิกห้องปฏิบัติการที่สมัครเข้าระบบเพื่อขอขึ้นทะเบียนห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตั้งแต่วันที่ 31 มกราคม จนถึงวันที่ 25 พฤษภาคม 2563 จำนวน 166 แห่ง ได้รับวัตถุทดสอบเพื่อทดสอบความชำนาญก่อนเปิดบริการ โดยเมื่อได้รับวัตถุทดสอบต้องตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีและชุดน้ำยาที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้ และส่งรายงานผลกลับทางอีเมล์ภายใน 3 วัน ซึ่งการรายงานผลประกอบด้วยข้อมูลชื่อชุดน้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอ ชื่อชุดน้ำยา real-time PCR รายงานผลเป็นผลบวกหรือผลลบ พร้อมระบุค่า Ct แยกตามยีนเป้าหมาย

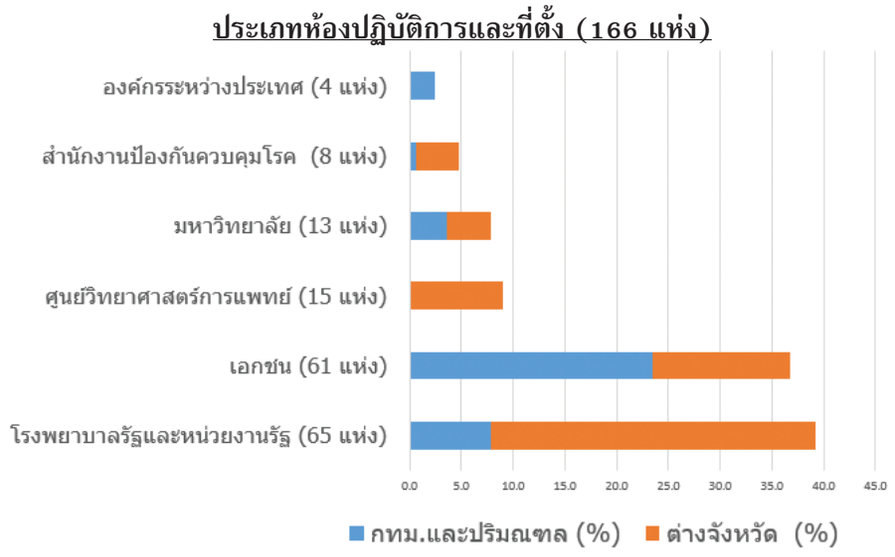
การประเมินผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ประเมินผลจากรายงานผลบวกหรือผลลบ แบ่งเกณฑ์เป็น 2 เกณฑ์ คือ (1) ยอมรับเมื่อให้ผลถูกต้องตามค่ากำหนดในวัตถุทดสอบทั้งหมดจำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 และ (2) ควรปรับปรุง เมื่อรายงานผลไม่ถูกต้องตั้งแต่ 1 ตัวอย่างเป็นต้นไป สำหรับค่า Ct นำมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความไวของแต่ละยีนโดยไม่แยกชุดน้ำยา ระหว่างกลุ่มน้ำยาและแยกยีนเป้าหมาย ด้วย Mann-Whitney U Test ค่า p-value <0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ[5, 6]

ผล

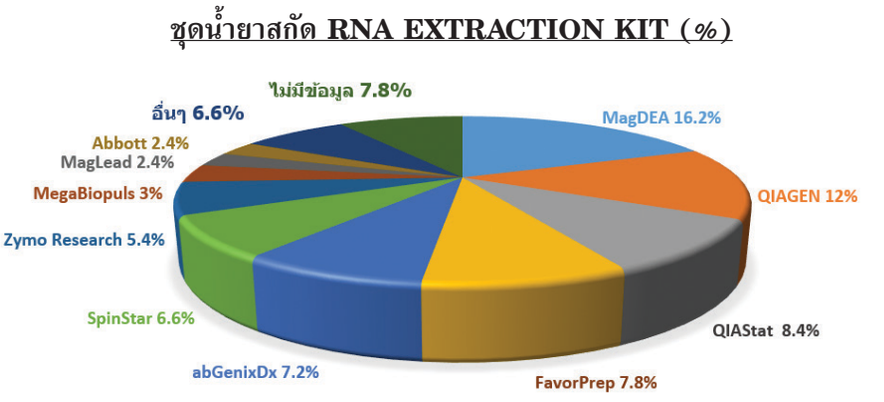
การจำแนกชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมและน้ำยา real-time PCR ที่ห้องปฏิบัติการใช้

สมาชิกห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญตรวจเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR จำนวนทั้งหมด 166 ห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็นห้องปฏิบัติการในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑลจำนวน 63 แห่ง และต่างจังหวัด จำนวน 103 แห่ง แบ่งเป็นหน่วยงานจากภาครัฐ โรงพยาบาล มหาวิทยาลัยและภาคเอกชน รายละเอียดแสดงในภาพที่ 1



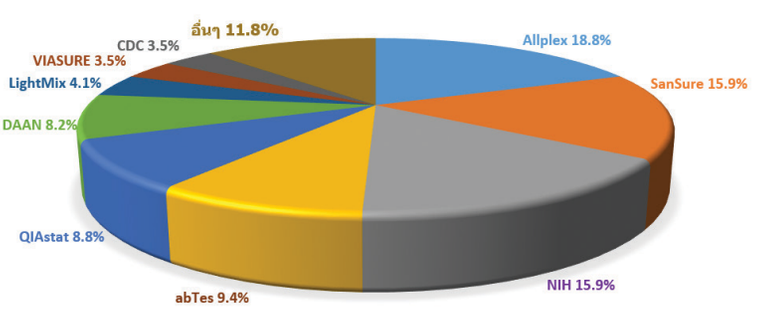
ภาพที่ 1 ประเภทของห้องปฏิบัติการและที่ตั้ง

จากข้อมูลของสมาชิก 166 แห่ง พบว่าการเลือกใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอมีความหลากหลายดังแสดงในภาพที่ 2 โดยชุดสกัดที่ใช้มากที่สุดคือ MagDEA® Dx reagents มีจำนวน 27 แห่ง (ร้อยละ 16.2) รองลงมาคือ QIAGEN (QIAamp Viral RNA Mini kit และ RNeasy Mini kit) จำนวน 20 แห่ง (ร้อยละ 12.0) และห้องปฏิบัติการหนึ่งแห่งไม่ใช้ชุดสกัด ทั้งนี้ในช่วงแรกของการดำเนินงานไม่มีการขอข้อมูลชุดสกัด จึงไม่มีข้อมูลจากห้องปฏิบัติการ 13 แห่ง (ร้อยละ 7.8)



ภาพที่ 2 ชุดน้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้

ข้อมูลการใช้ชุดน้ำยา real-time PCR ของห้องปฏิบัติการมีความหลากหลายแยกออกเป็นการใช้ชุดน้ำยาที่ผลิตโดยบริษัท (commercial kit) มีห้องปฏิบัติใช้จำนวน 132 แห่ง (ร้อยละ 79.5) ในจำนวนนี้มีห้องปฏิบัติการ 3 แห่งที่ใช้ commercial kit มากกว่า 1 บริษัท ซึ่งชุดน้ำยาดังกล่าวมีความแตกต่างกันตามยีนเป้าหมายที่ต้องการตรวจจับ เช่น ยีน *N, ORF, RdRp* และ *E* โดยชุดน้ำยาที่ตรวจวิเคราะห์เพียง 1 ยีน แต่อาจจะมีหลายตำแหน่ง มี 3 ผลิตภัณฑ์ คือ abTes, BGI และ Genesig ชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์ 2 ยีนเป้าหมาย มี 14 ผลิตภัณฑ์ และชุดน้ำยาที่ใช้ 3 ยีนเป้าหมาย มี 1 ผลิตภัณฑ์ คือ Allplex ส่วนที่เหลือ 34 แห่ง (ร้อยละ 20.5) ใช้ชุดน้ำยาที่พัฒนาโดยหน่วยงาน (In-house method) โดยจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มแรกห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นใช้เอง มี 3 แห่ง กลุ่มที่สองใช้วิธีการของ Centers for Disease Control and Prevention (US-CDC) ตรวจวิเคราะห์ 1 ยีน ที่ 3 ตำแหน่ง คือ *N1*, *N2* และ *N3* มีห้องปฏิบัติใช้ 6 แห่ง กลุ่มที่สามใช้วิธีของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Thai NIH) ตรวจวิเคราะห์ 2 ยีนเป้าหมาย คือ *N* และ *RdRp* มีห้องปฏิบัติใช้ 25 แห่ง ชุดน้ำยาที่นิยมเลือกใช้มากที่สุด 6 ผลิตภัณฑ์ (คิดเป็นร้อยละ 77) คือ Allplex, Sansure, abTES, Thai NIH, QIAStat และ DAAN รายละเอียดในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ชุดน้ำยา real-time PCR ที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้

ผลการประเมินความสามารถทางห้องปฏิบัติการ

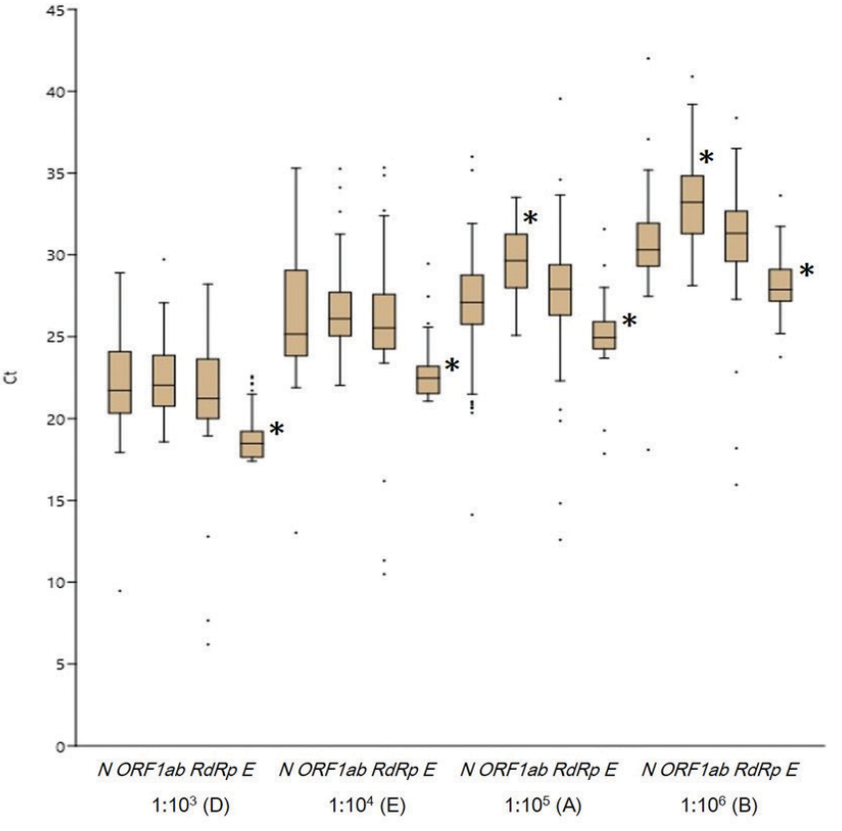
จากจำนวนห้องปฏิบัติการ 166 แห่ง ที่สมัครเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญพบว่า ห้องปฏิบัติการจำนวน 164 แห่ง (ร้อยละ 98.8) ผ่านการประเมิน คือ ตอบผลถูกต้องตามค่ากำหนดในวัตถุทดสอบทั้งหมดจำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 อีก 2 แห่ง (ร้อยละ 1.2) อยู่ในเกณฑ์ที่ต้องปรับปรุง ซึ่งสมาชิกที่ต้องปรับปรุงได้รับชุดวัตถุทดสอบใหม่ เพื่อนำไปทดสอบซ้ำด้วยน้ำยาชุดเดิม โดยทั้ง 2 แห่ง สามารถรายงานผลถูกต้องในครั้งที่ 2 จึงสามารถขึ้นทะเบียนเปิดให้บริการได้ เมื่อวิเคราะห์ผลที่ห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง รายงานผลไม่ถูกต้องในตัวอย่างบวก หรือเกิดผลลบปลอม พบว่าห้องปฏิบัติการ รหัส SS-205 รายงานผลไม่ถูกต้องในตัวอย่าง A ($1:10^5$) และ D ($1:10^3$) และห้องปฏิบัติการ รหัส SS-55 รายงานผลไม่ถูกต้องในตัวอย่าง B ($1:10^6$) ส่วนวัตถุทดสอบตัวอย่าง C ซึ่งเตรียมจาก HEp-2 cells สมาชิกทั้ง 2 แห่ง รายงานผลถูกต้องร้อยละ 100 รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นไวรัสของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบและจำนวนรายงานผลที่ตอบได้ถูกต้อง (เฉพาะชุดน้ำยา 6 ผลิตภัณฑ์)

ตัวอย่าง	เชื้อและความเข้มข้น	ผลถูกต้อง (%)	ชื่อชุดน้ำยา	Ct (Mean±SD) , 165 ข้อมูลที่รายงานค่า Ct					จำนวนแยกตามน้ำยาและยีน
				N	*ORF1ab/1a*	*RdRp*	*E*	*RdRp&E*	
A	SARS-CoV-2, $1:10^5$	Positive, 99.4% (165/166*100)	Allplex	27.5± 2.4		27.3± 2.9	25.0± 2.4		32
			Sansure	27.2± 1.2	29.2± 1.8				27
			abTES		29.5± 1.9				32
			Thai NIH	24.6± 5.0		25.5± 6.3			25, 12
			DAAN	27.9± 1.9	29.3± 2.7				14
			QIAStat					29.9± 2.8	15
B	SARS-CoV-2, $1:10^6$	Positive, 99.4% (165/166*100)	Allplex	30.5± 1.8		30.5± 2.0	28.3± 1.9		32
			Sansure	30.7± 1.5	32.6± 1.9				27
			abTES		33.8± 3.1				32
			Thai NIH	30.0± 4.4		29.3± 6.0			25, 12
			DAAN	31.1± 1.9	32.6± 2.6				14
			QIAStat					33.0± 1.6	15
C	HEp-2 cells	Negative, 100%	Allplex						32
			Sansure						27
			abTES						32
			Thai NIH						25, 12
			DAAN						14
			QIAStat						15
D	SARS-CoV-2, $1:10^3$	Positive, 99.4% (165/166*100)	Allplex	21.3± 1.7		21.0± 2.0	18.9± 1.6		32
			Sansure	20.9± 1.9	22.6± 2.0				27
			abTES		21.8± 1.5				32
			Thai NIH	24.4± 4.2		20.7± 6.9			25, 12
			DAAN	21.8± 1.9	22.6± 2.5				14
			QIAStat					23.0± 1.9	15
E	SARS-CoV-2, $1:10^4$	Positive, 100%	Allplex	25.0± 2.2		25.5± 2.4	22.8± 1.9		32
			Sansure	24.8± 2.3	26.8± 2.3				27
			abTES		26.1± 2.8				32
			Thai NIH	29.8± 4.8		25.3± 7.9			25, 12
			DAAN	25.8± 2.3	26.7± 2.5				14
			QIAStat					27.8± 2.5	15

ผลการวิเคราะห์ความไวของการตรวจยีนเป้าหมายจากค่า Cycle threshold (Ct)

การประเมินความสามารถทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค real-time PCR วัดจากการตอบผลพบหรือไม่พบเชื้อ SARS-CoV-2 ในตัวอย่าง การพบหรือไม่พบเชื้อ แต่ละห้องปฏิบัติการมีเกณฑ์ในการสรุปผลจากการดูค่า Cycle threshold (Ct) และ ค่า Cut-off ที่แต่ละชุดน้ำยาตั้งเกณฑ์ไว้ โดยค่า Ct น้อยกว่าค่า Cut-off ถือว่าให้ผลบวกหรือพบยีนเป้าหมาย ในทางกลับกัน ค่า Ct มากกว่าค่า Cut-off ถือว่าให้ผลลบหรือไม่พบยีนเป้าหมาย ค่า Ct จึงเป็นค่าผกผันกับความเข้มข้นของไวรัส และสามารถประมาณการค่าความแรงของเชื้อในตัวอย่างได้ เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า Ct จากจำนวนทั้งหมด 165 ข้อมูล (ห้องปฏิบัติการแห่งหนึ่งใช้เทคนิคที่แตกต่าง ไม่มีค่า Ct แต่ให้รายงานผลถูกต้องทั้งหมด) พบว่าชุดน้ำยาโดยส่วนใหญ่มีค่า Ct สอดคล้องกับความเข้มข้นของไวรัส ส่วนการเปรียบเทียบว่ายีนใดมีความไวในการตรวจพบเชื้อ SARS-CoV-2 พิจารณาจากค่าสัญญาณในการตรวจพบ หากค่า Ct ต่ำ หมายถึงมีเชื้อไวรัสตั้งต้นมากหรือชุดตรวจมีความไวสูงในการตรวจพบ รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างวัตถุทดสอบกับค่า Ct ของแต่ละยีน โดยใช้ข้อมูลรวมของชุดน้ำยา 6 ชุด



ภาพที่ 4 การกระจายของค่า Ct เปรียบเทียบกับยีนเป้าหมาย *N, ORF1ab, RdRp, E* และตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ Boxplot แสดงความหนาแน่นและการกระจายของข้อมูลค่า Ct จากการทดสอบ แกน y แสดงค่า Ct แกน X แสดงความเข้มเข้นของตัวอย่างทดสอบ โดยในแต่ละตัวอย่างได้แยกเป็น 4 กลุ่มยีน จากข้อมูลชุดน้ำยา 6 ชุด ที่มีห้องปฏิบัติการใช้มากที่สุด ใน Boxplot แสดงค่ามัธยฐาน (Median) เป็นค่ากลาง ตำแหน่งการกระจายของข้อมูลแสดงโดยค่าควอไทล์ที่ 1 (ขอบล่าง) และควอไทล์ที่ 3 (ขอบบน) เครื่องหมาย* แสดงยีนที่มีค่า Ct เฉลี่ยแตกต่างกับยีนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann-Whitney U Test, p value < 0.01) เมื่อเปรียบเทียบในตัวอย่างเดียวกัน ชุดน้ำยาที่มียีนเป้าหมายเป็น ยีน *ORF1ab* นับรวม *ORF1ab, ORF1a, NS1, NS2* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนวิธี CDC มีการออกแบบ ยีน *N นับรวม N1, N2* และ *N3 ส่วน QIAStat* เป็นชุดน้ำยาที่การรายงานผลไม่ได้แยกค่า Ct ว่าเป็นของ ยีน *RdRp หรือ ยีน E*

ที่มีห้องปฏิบัติการใช้มากที่สุด (Allplex, Sansure, abTES, Thai NIH, DAAN และ QIAStat; ตารางที่ 1) ซึ่งมียีนเป้าหมายคือยีน *N* (จำนวน 98 ข้อมูล) *ORF1ab* (จำนวน 73 ข้อมูล) *RdRp* (จำนวน 59 ข้อมูล) และ *E* (จำนวน 32 ข้อมูล) โดยไม่แยกชุดน้ำยา จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยค่า Ct ของแต่ละยีนพบว่า ค่า Ct เฉลี่ยของยีน *E* ต่ำกว่าค่า Ct เฉลี่ยของยีนอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) ทดสอบด้วย Mann-Whitney U Test โดยมีความแตกต่างกับยีนอื่นในทุกตัวอย่างทดสอบ ได้แก่ ตัวอย่าง D, E, A และ B ซึ่งมีความเข้มข้นของไวรัสเป็น $1{:}10^3$, $1{:}10^4$, $1{:}10^5$ และ $1{:}10^6$ ตามลำดับ และค่า Ct เฉลี่ยของยีน *ORF1ab* สูงกว่าค่า Ct เฉลี่ยของยีนอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) ทดสอบด้วย Mann-Whitney U Test เมื่อทดสอบกับตัวอย่าง A และ B (ความเข้มข้น $1{:}10^5$ และ $1{:}10^6$) (รูปที่ 4) ขณะที่ค่า Ct เฉลี่ยของยีน *N* และ *RdRp* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกตัวอย่าง

วิจารณ์

ตั้งแต่เริ่มมีการระบาดของโรคโควิด-19 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ทางห้องปฏิบัติการเป็นเรื่องจำเป็นเร่งด่วน ประกอบกับนโยบายของประเทศไทยในการเพิ่มจำนวนห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคโควิด-19 อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถรายงานผลที่น่าเชื่อถือและทันเวลา เพื่อการตรวจจับและควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว การทดสอบความชำนาญก่อนเปิดบริการเป็นการดำเนินการครั้งแรกของประเทศไทย จึงได้รวบรวมผลจากสมาชิกนำมาวิเคราะห์เพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงวิชาการ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการ ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึง การเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการในประเทศไทย ซึ่งมีความพร้อมในการเปิดบริการตรวจไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR ทั่วประเทศ มีจำนวนถึง 166 ห้องปฏิบัติการ ภายในระยะเวลา 4 เดือน แม้จะเป็นช่วงที่โรคมีการระบาดในอัตราที่สูง ทำให้ประเทศผู้ผลิตน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์ได้รับผลกระทบอย่างมาก จนเป็นเหตุให้ชุดน้ำยาและวัสดุวิทยาศาสตร์ขาดแคลน ที่สำคัญห้องปฏิบัติการจำนวน 164 แห่ง (ร้อยละ 98.8) สามารถผ่านการประเมินความสามารถ แม้ว่าห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง ไม่ผ่านการประเมินในรอบแรก กล่าวคือรายงานผลลบปลอม ทั้งนี้อาจเกิดจากชุดน้ำยาสกัดตัวอย่างที่เลือกใช้ แต่ได้ปรับปรุงแก้ไขข้อผิดพลาดจนสามารถผ่านการประเมินในรอบที่ 2

ส่วนของการนำค่า Ct จากทุกตัวอย่างมาวิเคราะห์ในภาพรวมแยกตามยีนเป้าหมายนั้น ผลการศึกษามีความสอดคล้องกับงานวิจัยในต่างประเทศที่พบว่า การตรวจหา *E gene* มีความไวสูงกว่ายีนอื่น ๆ เนื่องจากไพร์เมอร์และโพรบที่ชุดน้ำยาส่วนใหญ่ออกแบบจะเป็นตำแหน่งของลำดับเบสที่พบในกลุ่ม sarbeco virus (SARS-CoV-1 และ SARS-CoV-2) ส่วนยีนเป้าหมายอื่น ๆ เช่น *N, ORF1ab* และ *RdRp* จะมีความจำเพาะกับเชื้อ SARS-CoV-2 เท่านั้นเมื่อมีความจำเพาะมากขึ้น ความไวของยีนเหล่านั้นจึงต่ำกว่า *E gene* [7]

สรุป

การประเมินผลการทดสอบความชำนาญเพื่อขึ้นทะเบียนห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจวินิจฉัย SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR แสดงให้เห็นว่าสมาชิกส่วนใหญ่มีกระบวนการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง นอกเหนือจากการเลือกชุดน้ำยาที่มีคุณภาพ การทดสอบโดยผู้ปฏิบัติงานมีความน่าเชื่อถือ แผนทดสอบความชำนาญที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จัดตั้งขึ้นจะเกิดประโยชน์สูงสุด หากสมาชิกเข้าร่วมแผนนี้อย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการเฝ้าระวังความถูกต้อง และความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบตลอดการให้บริการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการกรอกข้อมูลที่ครบถ้วน ทำให้การศึกษาครั้งนี้มีความสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: laboratory testing for 2019-nCoV in humans. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 20]; [5 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-%ADcoronavirus-%AD2019/technical-%ADguidance/laboratory-%ADguidance.
2. 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. [serial online]. 2020; [cited 2020 Jun 5]; 25(3): [8 screens]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6988269/pdf/eurosurv-25-3-5.pdf.
3. สำนักสารนิเทศ สำนักปลัดกระทรวงสาธารณสุข. สธ. เผย 93 ห้องปฏิบัติการทุกสังกัด ตรวจโควิด-19 แล้วกว่า 100,000 ตัวอย่าง. ข่าวเพื่อสื่อมวลชน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 25 พ.ค. 2563]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://pr.moph.go.th/?url=pr/detail/2/04/141276/.
4. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การรับรองห้องปฏิบัติการตรวจเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หนึ่งห้องปฏิบัติการหนึ่งจังหวัด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 30 เม.ย. 2563]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www3.dmsc.moph.go.th/post-view/766.
5. Seong MW, Lee SJ, Cho SI, Ko K, Kim MN, Sung H, et al. External quality assessment of MERS-CoV molecular diagnostics during the 2015 Korean outbreak. Ann Lab Med 2016; 36(3): 230-4.
6. 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.
7. D'Cruz RJ, Currier AW, Sampson VB. Laboratory testing methods for novel severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Front Cell Dev Biol. [serial online]. 2020; [cited 2020 Jun 15]; 8: [11 screens]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7287038/pdf/fcell-08-00468.pdf.

Laboratory Performance on SARS-CoV-2 Detection by real-time PCR: A Prerequisite Evaluation for DMSc Laboratory Network

Sunthareeya Waicharoen[1] Pilailuk Akkapaiboon Okada[1] Siriphan Saeng-aroon[1] Kampaew Buayai[1] Sirichol Kala[1] Don Changsom[1] Khanthiwa Chairad[1] Ratravee Boonmuang[1] Nanthawan Mekha[1] Malinee Chittaganpitch[2] and Ballang Uppapong[1]

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

ABSTRACT Laboratory diagnosis on SARS-CoV-2 infection among suspected cases is crucial for effectiveness of control measure in order to limit COVID-19 transmission. Participation in proficiency testing (PT) is a prerequisite requirement prior to registering a service on SARS-CoV-2 detection using real-time PCR with the DMSc laboratory network. We, therefore, established the PT scheme to the network. The scheme panel was consisted of one negative and four positive samples with different concentrations of SARS-CoV-2 and distributed to 166 laboratories during January 31 to May 25, 2020. Our findings revealed that 166 laboratories (98.8%) showed results with 100% accuracy as compared with the panel, while 2 laboratories (1.2%) needed improvement on their performance. In addition, it was found that sensitivity of real-time PCR kits with gene *E* as targets is higher than those with genes *N*, *ORF*, and *RdRp*, as determined by cycle threshold. Evaluation of laboratory performance on SARS-CoV-2 detection prior to starting their services, can ensure customers on laboratory reliability and competencies. Hence, to monitor accuracy and reliability of testing performance throughout their services of SARS-CoV-2 testing, the DMSc laboratory network should continuously participate in this PT program.

Keywords: Proficiency testing, real-time PCR, SARS-CoV-2