



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2563

Vol. 62 No. 3 July - September 2020



ISSN 0125-684X
E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.โอภาส การย์กวินพงศ์ นพ.สมฤกษ์ จิงสมา	นพ.พิเชฐ บัญญัติ นพ.สมชาย แสงกิจพร
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท นางสาวสุมล ปิตรานนท์ นางปราณี ขวลิธอำรง	พญ.มยุรา กุสุมภ์ ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ นางปนัดดา ชิลวา นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์
บรรณาธิการ รองบรรณาธิการ	ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ ดร.เดือนถนนอม พรหมชาติแก้ว นายสุธน วงษ์ชัย ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน	นางกนกพร อธิสุข นางวิชุดา จริยะพันธุ์ นางสาวมาลินี จิตตกานต์พิชัย
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ.พญ.พรณี ปิติสุทธิธรรม ดร.นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ รศ.ดร.พญ.พนิตทิพย์ พงษ์เพชร ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุสุข ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล ภญ.ดร.สุภาณี ดวงธีรปริชา ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก ภญ.ดร.ไตรพร วัฒนนาถ	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยรามคำแหง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กำหนดออก อัตราสมาชิก	ราย 3 เดือน ในประเทศปีละ 200.- บาท ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา	
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	บริษัท ธนอรุณการพิมพ์ จำกัด 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2563

Vol. 62 No. 3 July - September 2020

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การศึกษาจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่พบ ณ สนามมวยและสถานบันเทิง
ในเขตกรุงเทพมหานครของประเทศไทย 133
พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ สิริภาภรณ์ ผุยกัน สติพร ปานเม่น ธนัสภา ธนเดชากุล
สิริชล กาละ วันดี มีฉลาด หทัยกาญจน์ ทันไชย ภากร ภิมย์ทอง วรารวรรณ วงษ์บุตร
รัตนา ตาเจริญเมือง สุนทรียา วัยเจริญ มาลินี จิตตกานต์พิชัย บัลลังก์ อุปพงษ์
และโอภาส การย์กวินพงศ์
- การพัฒนาชุดน้ำยา DMSc COVID-19 real-time RT-PCR 143
พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ วรารวรรณ วงษ์บุตร ธนัสภา ธนเดชากุล สิริภาภรณ์ ผุยกัน
สิริชล กาละ วันดี มีฉลาด สุนทรียา วัยเจริญ มาลินี จิตตกานต์พิชัย และบัลลังก์ อุปพงษ์
- การโคลนและการแสดงออกโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่มีศักยภาพในการจับกับ
ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 155
อภิชัย ประชาสุภาพ กษรัตน์ จงปิตุทรัพย์ นลินี แสงทอง พันธธิดา ตรียวง
พรทิพย์ ไชยยะ และปนัดดา เทพอัศธร
- การพัฒนาและประเมินคุณภาพชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดี IgM/IgG ต่อ SARS-CoV-2 167
ชนิดรวดเร็วโดยอิมมูโนโครมาโทกราฟี
ปนัดดา เทพอัศธร อณิชา เลื่องชัยแขม อภิชัย ประชาสุภาพ สกฤตรัตน์ สุนทรฉัตรวัฒน์
กษรัตน์ จงปิตุทรัพย์ พรทิพย์ ไชยยะ กวีวรรณ มงคลศิริ พันธธิดา ตรียวง นลินี แสงทอง
ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ ลภัสรดา มุ่งมงคล กฤตมน โสภณติลก และอาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์
- การพัฒนาชุดตรวจหลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับตรวจทางห้องปฏิบัติการทางน้ำเหลืองวิทยา
โรคโควิด-19 179
ลภัสรดา มุ่งมงคล พรทิพย์ ไชยยะ ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ สกฤตรัตน์ สุนทรฉัตรวัฒน์
สุมาลี ชะนะมา อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์ และปนัดดา เทพอัศธร
- การพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี Reverse Transcription
Droplet Digital PCR 194
นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา ณัฐกุล บุญเนื่อง วิมาลา อินอุ่นโชติ วรวิษฐา แสงดี และสุรัคเมธ มหาศิริมงคล

บทความทั่วไป

การประเมินคุณภาพชุดน้ำยาตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR เพื่อขึ้นทะเบียนจำหน่ายในกรณีเร่งด่วน	205
ดนตรี ช่างสม สิริพรรณ แสงอรุณ ธนัสภา ธนเดชากุล จิตติพร ห่านตระกูล โศภิตา กาหลง ชันธิ์ทิวา ชัยราช นันทวรรณ เมฆา พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ นภวรรณ เจริญใจ มალიณี จิตตกานต์พิชัย และบัลลังก์ อุปพงษ์	
การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 ในประเทศไทย	220
อาชวินทร์ ไรจน์วิวัฒน์ วิโรจน์ พงษ์ทับทิม กฤษณ์ชัย จันทเพ็ชร วรางลักษณ์ พิมพากัย ทศนีย์ ไชยคำ สุวนิดา เสนาวรานนท์ ชญาดา ทองคำแสน จีรภา ศิลาเกษ คณิศร ลาภอดิสร สกฤตรัตน์ สุนทรจัตราวัฒน์ และปนัดดา เทพอัคร	
การเตรียมชุดตัวอย่างสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงของประเทศไทย	231
วิโรจน์ พงษ์ทับทิม กฤษณ์ชัย จันทเพ็ชร วรางลักษณ์ พิมพากัย ทศนีย์ ไชยคำ สุวนิดา เสนาวรานนท์ ชญาดา ทองคำแสน จีรภา ศิลาเกษ คณิศร ลาภอดิสร สกฤตรัตน์ สุนทรจัตราวัฒน์ ปนัดดา เทพอัคร และอาชวินทร์ ไรจน์วิวัฒน์	
การทดสอบความชำนาญเพื่อขึ้นทะเบียนห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์	243
การแพทย์ตรวจวินิจฉัย SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR	
สุนทรียา วยเจริญ พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ สิริพรรณ แสงอรุณ คำแพว บัวใหญ่ สิริชล กาละ ดนตรี ช่างสม ชันธิ์ทิวา ชัยราช รัตน์ระวี บุญเมือง นันทวรรณ เมฆา มალიณี จิตตกานต์พิชัย และบัลลังก์ อุปพงษ์	
การพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการรองรับการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019	252
พัทธนันท์ ธนพัฒสิริกุล วรรณนีย์ มาศจำรัส สุภาภรณ์ แซ่ตัน และจิราภรณ์ เพชรรักษ์	
การตรวจ SARS-CoV-2 ในกลุ่มแรงงานต่างด้าว จังหวัดสมุทรสาคร: ถอดบทเรียนการจัดการเก็บน้ำลาย	261
ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์ สิริลดา สุพรรณคง วิภาดา ขวัญแก้ว สุนันท์ทิพย์ ปุจฉาการ ปานทิพย์ ศิริโชติ นุสรุ สัตย์เพริศพราย และนวลจันทร์ วิจิษณ์จินดา	
การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ เพื่อสุขอนามัยสำหรับมือด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี	268
เมเนกา วีน และวงเดือน นาคนิยม	

บทความพิเศษ

การประเมินคุณภาพชุดทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคโควิด - 19 เพื่อใช้ในกรณีสภาวะเร่งด่วน	281
สุทธวิวัฒน์ ลำไย และคณะกรรมการพิจารณาและประเมินชุดทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา สำหรับโรคโควิด 2019	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 62 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2563

Vol. 62 No. 3 July - September 2020

CONTENTS

Page

Original Articles

SARS-CoV-2 : PUB and Boxing Stadium in Bangkok, Thailand 133

*Pilailuk Akkapaiboon Okada Siripaporn Phuygun Sitthiporn Parnmen
Thanutsapa Thanadachakul Sirichol Kala Wandee Meechalard Hathaikan Thanchai
Pakorn Piromtong Warawan Wongboot Ratana Tacharoenmuang Sunthareeya Waicharoen
Malinee Chittaganpitch Ballang Uppapong and Opart Karnkawinpong*

Development of DMSc COVID-19 real-time RT-PCR 143

*Pilailuk Akkapaiboon Okada Warawan Wongboot Thanutsapa Thanadachakul
Siripaporn Phuygun Sirichol Kala Wandee Meechalard Sunthareeya Waicharoen
Malinee Chittaganpitch and Ballang Uppapong*

Cloning and Expression of Human Monoclonal Antibody with Potent Binding to 2019 Novel Coronavirus 155

*Apichai Prachasuphap Kodcharad Jongpitisub Nalinee Saengtong
Pantida Treeyoung Porntip Chaiya and Panadda Dhepakson*

Development and Evaluation of A Rapid Test for SARS-CoV-2 IgM/IgG Detection by Immunochromatography 167

*Panadda Dhepakson Anicha Luengchaichawang Apichai Prachasuphap
Sakulrat Soonthornchatrawat Kodcharad Jongpitisub Porntip Chaiya
Kaveewan Mongkolsiri Pantida Treeyoung Nalinee Saengtong Parnuphan Panyajai
Lapasrada Mungmongkol Kritsamon Sophondilok and Archawin Rojanawiwat*

Development of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of COVID-19 179

*Lapasrada Mungmongkol Porntip Chaiya Parnuphan Panyajai
Sakulrat Soonthorncharttrawat Sumalee Chanama Archawin Rojanawiwat
and Panadda Dhepakson*

Establishment of SARS-CoV-2 Quantification by Reverse Transcription Droplet Digital PCR 194

*Nuanjun Wichukchinda Natthakul Bunnueang Wimala Inunchot
Waritta Sawaengdee and Surakameth Maharisimongkol*

General Article

- Pre-marketing Evaluation of real-time RT PCR Test Kits for SARS-CoV-2 Detection: Thailand Emergency Use Authorization** 205
*Don Changsom Siriphan Saeng-aroon Thanutsapa Thanadachakul
 Thitiphorn Hantragool Sopita Kalong Khanthiwa Chairad Nanthawan Mekha
 Pilailuk Akkapaiboon Okada Noppavan Janejai Malinee Chittaganpitch
 and Ballang Uppapong*
- Performance Evaluation of SARS-CoV-2 Antibody Test Kits in Thailand** 220
*Archawin Rojanawiwat Wiroj Puangtabtim Kritchai Juntaped Warangluk Pimpapai
 Tassanee Chaiyakum Suwanida Senawaranon Chayada Tongkamsen
 Jeerapa Srilaket Kanisorn Larpardisorn Sakulrat Soonthornchartrawat
 and Panadda Dhepakson*
- Preparation of Panel Samples to Evaluate Antibody Test Kits for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2019 in Thailand** 231
*Wiroj Puangtabtim Kritchai Juntaped Walangluk Pimpapai Tassanee Chaiyakum
 Suwanida Senawaranon Chayada Tongkamsen Jeerapa Srilaket
 Kanisorn Larpardisorn Sakulrat Soonthornchartrawat Panadda Dhepakson
 and Archawin Rojanawiwat*
- Laboratory Performance on SARS-CoV-2 Detection by real-time PCR: A prerequisite Evaluation for DMSc laboratory Network** 243
*Sunthareeya Waicharoen Pilailuk Akkapaiboon Okada Siriphan Saeng-aroon
 Kampaew Buayai Sirichol Kala Don Changsom Khanthiwa Chairad
 Ratavee Boonmuang Nanthawan Mekha Malinee Chittaganpitch
 and Ballang Uppapong*
- Laboratory Capacity Building to Support the Pandemic of Coronavirus Disease 2019** 252
*Phatthanan Thanaphatsiriyakul Thatsanee Masjamras Supaporn Seatan
 and Jiraporn Phetrak*
- Detection of SARS-CoV-2 in Foreign Workers at Samut Sakhon Province: Lessons Learned from Saliva Samples Collection** 261
*Siriwan Chaisomboonpan Sirilada Suphankong Wiphada Khwankaew
 Sukontip Putcharkarn Pantip Sirichote Nusara Satproedprai
 and Nuanjun Wichukchinda*
- Method Validation of Alcohol Contents in Alcohol-based Hand Sanitizer Products Using Gas-chromatography** 268
Menaka Vivon and Wongduan Nakniyom

Special Article

- Evaluation of COVID-19 Serology Test Kits for Emergency Used Authorization** 281
Suttiwat Lamyai and Evaluation Committee



บรรณาธิการแถลง



การระบาดของโควิด-19 ที่เกิดขึ้นทั่วโลก และองค์การอนามัยโลกได้ประกาศเป็น Public Health Emergency of International Concern นั้น ส่งผลให้ทุกภาคส่วนของประเทศเร่งดำเนินการเพื่อให้สามารถตรวจจับและควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว พร้อมป้องกันการแพร่ระบาดในวงกว้างอย่างเร่งด่วน เช่น การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อที่ระบาดในประเทศ การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ การพัฒนาชุดทดสอบเพื่อการพึ่งพาตนเอง การตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์และสาธารณสุข การจัดระบบเครือข่ายห้องปฏิบัติการโควิด-19 เป็นต้น

วารสารฯ ฉบับนี้ ประกอบด้วยบทความที่เกี่ยวข้องกับโควิด-19 ที่ได้มีการศึกษาวิจัยตั้งแต่เริ่มมีการระบาดในประเทศ นำผลการดำเนินงานมาเผยแพร่เพื่อใช้อ้างอิง และศึกษาต่อยอดให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป อย่างไรก็ตาม บทความโควิด-19 ที่อยู่ในระหว่างดำเนินการศึกษา หากประสงค์จะเผยแพร่ในวารสารฯ ขอให้ท่านส่งบทความได้ที่ <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/dmsc> เพื่อรับการพิจารณาเผยแพร่ในโอกาสต่อไป

บุษราวรรณ ศรีวรรณะ

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การศึกษาจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่พบ ณ สนามมวยและสถานบันเทิง ในเขตกรุงเทพมหานคร ของประเทศไทย

พิไลลักษณ์ อัคคไพบูลย์ โอภาตะ¹ สิริภาภรณ์ ผุยกัน¹ สิทธิพร ปานเม่น¹ ธนัสภา ธนเดชากุล¹ สิริชล กาละ¹
วันดี มีฉลาด¹ พัทธกาญจน์ ทันไชย¹ ภากร ภิมย์ทอง¹ วราวรรณ วงษ์บุตร¹ รัตนา ตาเจริญเมือง¹ สุนทรียา วัชรเจริญ¹
มาลินี จิตตกานต์พิชัย² บัลลังก์ อุปพงษ์¹ และโอภาส การย์กวินพงศ์³

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ³กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์
อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ สถานการณ์การติดเชื้อ Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ในประเทศไทย ตั้งแต่พบผู้ป่วยยืนยันรายแรกซึ่งเดินทางมาจากประเทศจีน เมื่อวันที่ 8 มกราคม 2563 จนกระทั่งช่วงต้นเดือนมีนาคม 2563 พบผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ ซึ่งคาดว่าจะเกิดการแพร่กระจายเชื้อในแหล่งสถานบันเทิงและสนามมวยในเขตกรุงเทพมหานคร การศึกษานี้รายงานรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยสัญชาติไทย 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสถาน บันเทิงและกลุ่มสนามมวยในประเทศไทย จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลโดยใช้ข้อมูลทั้งจีโนม ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยพบว่า เชื้อจากทั้ง 2 แหล่งจัดอยู่ใน clade S โดยมีสายสัมพันธ์ ใกล้เคียงกับเชื้อจากเกาหลีใต้และฮ่องกงในรูปแบบ sister lineage และสายพันธุ์เชื้อจากประเทศสเปนและเม็กซิโกในรูปแบบ basal lineage ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ใน clade L ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากประเทศจีนในช่วงแรก ของการระบาดของโรคโควิด-19 ในประเทศไทย ผลจากการวิเคราะห์สามารถอนุมานได้ว่าเชื้อ SARS-CoV-2 จากทั้ง 2 แหล่ง ที่พบในประเทศไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากเชื้อต้นกำเนิดที่เป็นศูนย์กลางการระบาดในประเทศจีน

คำสำคัญ: เชื้อ SARS-CoV-2, โควิด-19, สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Corresponding author E- mail: pilailuk.o@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 18 August 2020

Accepted: 2 September 2020

บทนำ

สถานการณ์ระบาดของโรคติดต่อทางเดินหายใจจากไวรัสโคโรนา 2019 ครั้งแรกที่เมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ ประเทศจีน และพบผู้ป่วยอีกหลายเมืองของประเทศจีน รวมถึงต่างประเทศ เช่น ประเทศไทย ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และเกาหลีใต้ เป็นต้น โดยผู้ป่วยที่พบในต่างประเทศยังมีความเชื่อมโยงกับเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน จากรายงานผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตที่เพิ่มขึ้น และพบในหลายพื้นที่ ตลอดจนมีรายงานการติดต่อระหว่างคนสู่คนภายในประเทศ องค์การอนามัยโลก ประกาศให้สถานการณ์แพร่ระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 เป็นภาวะฉุกเฉินด้านสาธารณสุขระหว่างประเทศ (Public health Emergency of international Concern) เมื่อวันที่ 30 มกราคม 2563 และ เมื่อวันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2563 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศแจ้งชื่อโรคติดเชื้อและชื่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่อย่างเป็นทางการ คือ โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus disease; COVID-19) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)⁽¹⁾

การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 มีแนวโน้มเข้าสู่ภาวะวิกฤตด้านสาธารณสุขในหลายภูมิภาคของโลก นักวิจัยทั้งในจีนและอีกหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ออกรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างผู้ป่วย 2 รายแรกที่พบในประเทศไทย และพบว่าจีโนมมีความคล้ายคลึงกับจีโนมของผู้ป่วยชาวจีนเมืองอู่ฮั่น ทั้งนี้ผู้ป่วย 2 ราย ไม่มีความเกี่ยวข้องกันและไม่เคยไปที่ตลาดอาหารทะเลหัวหนาน ซึ่งคาดว่าเป็นแหล่งเริ่มต้นของเชื้อ จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อ SARS-CoV-2 ได้แพร่กระจายอยู่ในเขตพื้นที่ประเทศจีนก่อนสัปดาห์แรกของเดือนมกราคม 2563 หรือก่อนหน้า⁽²⁾

เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จัดอยู่ในจีนัสเบต้าโคโรนาไวรัส (Betacoronavirus) มีขนาด 60–140 นาโนเมตร หุ้มด้วยชั้นไขมัน มีสารพันธุกรรมเป็นชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว แบบสายบวก (positive single-stranded RNA) ขนาดจีโนม 27–32 กิโลเบส (kb) ประกอบด้วยยีน ORF (open reading frame; ORF1a, ORF1ab), RdRp (RNA-dependent RNA polymerase gene), S (spike protein gene), E (envelope protein gene), M (membrane protein gene), N (nucleocapsid protein gene)^(3, 4) Roujian Lu และคณะ ได้ศึกษาระบาดชีววิทยาระดับโมเลกุลและจำแนกเชื้อไวรัสโคโรนาตามจีโนมิกส์ พบว่าเชื้อ SARS-CoV-2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส bat-derived severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronaviruses, bat-SL-CoVZC45 และ bat-SL-CoVZXC21 ซึ่งเก็บตัวอย่างในเมือง Zhoushan ประเทศจีน เมื่อปี 2018 ร้อยละ 88 (identity) แต่มีระดับความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการห่างจากเชื้อ SARS-CoV (79% identity) และ MERS-CoV (50% identity) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้าน homology modelling พบว่าเชื้อ SARS-CoV-2 มีคุณสมบัติของโครงสร้าง receptor-binding domain ที่คล้ายคลึงกับเชื้อ SARS-CoV ถึงแม้จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับอะมิโนในบางตำแหน่ง^(5, 6) การศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของเชื้อ SARS-CoV-2 โดย Phan T ได้ศึกษาข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 86 สายพันธุ์ พบว่าในสารพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อไวรัสหลายสายพันธุ์เกิดการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์กว่า 93 ตำแหน่ง โดยส่วนใหญ่อยู่บนตำแหน่งของยีน non-structural และ structural protein ยีน ORF1ab polyprotein และยีน spike protein ตามลำดับ⁽⁷⁾ จากการเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่มีความหลากหลาย GISAID ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสากลได้มีการกำหนดรูปแบบสายพันธุ์ออกเป็น 6 รูปแบบ (clade) โดยอาศัยพื้นฐานของ marker mutation ดังนี้ 1) clade “S” 2) clade “L” ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบในระยะแรก จากนั้นมีการจำแนก clade “L” เป็น 3) clade “V” และ 4) clade “G” ในระยะต่อมาได้มีการจำแนก clade “G” เป็น 5) clade “GH” และ 6) clade “GR” เพื่อให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งทำให้เกิดระบาดทั่วโลกได้อย่างเป็นระบบและสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงตามระบบสากล⁽⁸⁾

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่พบในประเทศไทย จะสามารถติดตามวิวัฒนาการและการกลายพันธุ์ของเชื้อ เป็นประโยชน์ต่องานด้านการแพทย์และสาธารณสุข ทั้งด้านการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรค และพัฒนาวัคซีนในการป้องกันและรักษาโรค COVID-19 ในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ช่วยสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรค

วัสดุและวิธีการ

การแยกเชื้อไวรัส

เตรียมตัวอย่างสารคัดหลั่ง ได้แก่ Nasopharyngeal swab และ/หรือ Throat swab ของผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน กลุ่มสถาบันบันเทิงและกลุ่มสนามมวยจำนวน 16 ตัวอย่าง ที่แช่ใน Viral Transport Media (VTM) โดยเขย่าตัวอย่างให้เข้ากันนาน 15 วินาที ดูดตัวอย่างลงใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (มล.) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส (°C) ด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 45 นาที เก็บส่วนใสใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ในน้ำแข็ง

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cell, Elabscience, USA) เลี้ยงไว้ในที่อุณหภูมิ 37 ± 1 °C ที่มี 5% CO₂ ที่มีความสมบูรณ์อายุประมาณ 1-2 วัน ถ่าย growth medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่เติม Phosphate buffer saline (PBS) ซึ่งปราศจาก Mg²⁺ (PBS (-)) ที่มีส่วนผสมของ NaCl, KCl, Na₂HPO₄ และ KH₂PO₄ ปริมาตร 5 มล. ลงในขวดเพื่อล้างเซลล์ให้ทั่ว จากนั้นดูดสารละลาย PBS (-) ที่ทิ้ง และดูดตัวอย่างสารคัดหลั่งที่เตรียมไว้ประมาณ 0.5 มล. ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C ที่มี 5% CO₂ นาน 1 ชั่วโมง โดยทุก 15 นาที ให้นำขวดเลี้ยงเซลล์ออกมาจากตู้เลี้ยงขวดไปมาเพื่อให้ตัวอย่างสัมผัสกับเซลล์ทั่วทั้งขวดนานประมาณ 6 วินาที แล้วนำเข้าไปบ่มในตู้อีกครั้งเมื่อครบเวลาบ่ม 1 ชั่วโมง เติม maintenance medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ที่มี 2% FBS ปริมาตร 5 มล. และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C ที่มี 5% CO₂ นาน 5-7 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ cytopathic effect (CPE) ทุกวัน ภายใต้กล้อง Inverted Microscope เมื่อพบ CPE > 3+ ของเซลล์ทั้งหมด (หมายถึง เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ 75%) ให้ดูดเซลล์พร้อมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ใส่หลอด 15 มล. แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 2,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสเก็บใส่หลอดสำหรับแช่แข็ง (Cryotube) และนำไปตรวจยืนยันซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี real-time RT-PCR ก่อนนำเก็บที่อุณหภูมิ < -70 °C

การเตรียม DNA library

สกัด RNA จากเชื้อโคโรนาไวรัส 2019 (SARS-CoV-2) ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยชุดสกัด Nucleospin® RNA Virus-kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) และวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยชุดน้ำยา QUANT-iT RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาความเข้มข้น RNA ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียม DNA Library ด้วยชุดน้ำยา NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, USA) ความเข้มข้นเริ่มต้นของ dsRNA สำหรับการเตรียม DNA library เท่ากับ 10-100 ng เมื่อเตรียมได้ DNA library แล้วตรวจสอบผลผลิตโดยการทำ 2% Agarose gel electrophoresis อ่านตำแหน่งชิ้นส่วน DNA เปรียบเทียบกับ DNA marker และ First Bead/Second Bead: 0.45/0.20 positive control ขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่เหมาะสมในการทำ Library ประมาณ 300 bp วัดความเข้มข้นของ DNA Library ด้วยชุดน้ำยา QUANT-iT DNA BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA) นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาความเข้มข้น DNA ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิค Next-Generation Sequencing

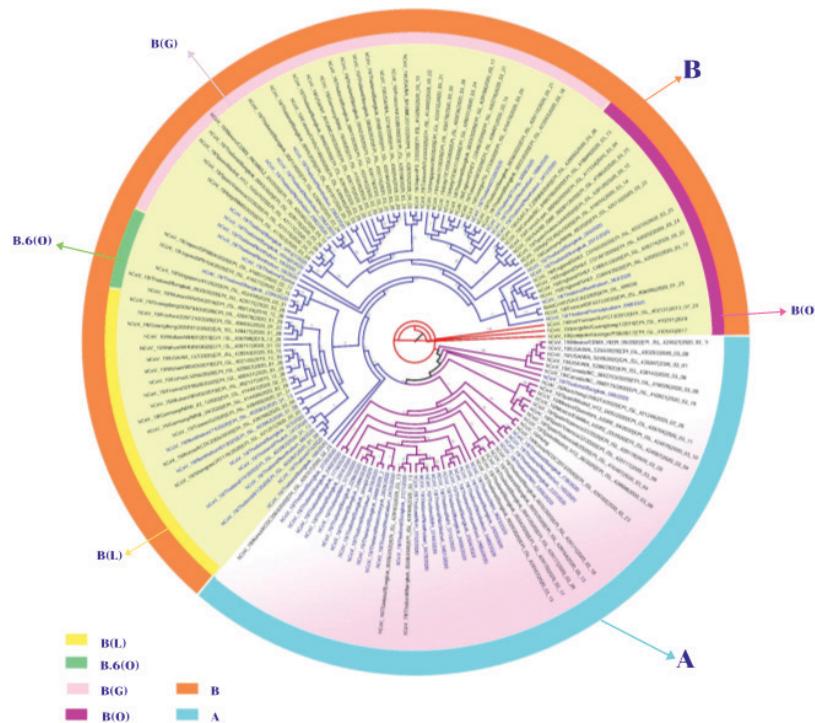
ปรับความเข้มข้นของตัวอย่าง DNA Library ที่เตรียมได้ในแต่ละหลอดด้วยน้ำ Nuclease-free water ให้ได้ความเข้มข้นที่ 2 nM แล้วนำตัวอย่างทุกหลอดมาผสมกันได้ความเข้มข้น 2 nM mix solution เติม 0.2 N NaOH 10 ไมโครลิตร (μl) ไปยัง 2 nM mix solution 10 μl ผสมสารให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1 nM เติม HT1 Hybridization Buffer (Illumina, USA) ที่อุณหภูมิ 2–8 °C 980 μl เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 20 pM ดูดสารละลายความเข้มข้น 20 pM 300 μl ไปยังหลอด 1.5 มล. ที่สะอาด และเติม HT1 Hybridization Buffer ที่อุณหภูมิ 2–8 °C 700 μl ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 6 pM ดูดสารละลายความเข้มข้น 6 pM ปริมาตร 600 μl ใส่ลงใน cartridges (MiSeq v2 reagent kit, 300-cycle (Illumina, USA) สำหรับเป็นตัวอย่างวิเคราะห์หาลำดับพันธุกรรมด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (Illumina MiSeq platform) ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยชีวสารสนเทศ

ข้อมูลที่ได้จากเครื่อง Miseq sequencer อยู่ในรูปของไฟล์นามสกุล R1_001.fastq และ R2_001.fastq นำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม CLC genomics workbench 12 (CLC bio, Aarhus, Denmark) และวิเคราะห์จำแนกกลุ่ม โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาทำ DNA sequence alignments เพื่อสร้าง DNA substitution matrix โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime version 2020.2 (Biomatters, New Zealand) จากนั้นนำ DNA substitution matrix มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลภายใต้อัลกอริทึม (algorithm) ของวิธีวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม RaxML ภายใต้ระบบ CIPRES portal⁽⁹⁾ ในการคำนวณความน่าจะเป็นของข้อมูลภายใต้โมเดลทางวิวัฒนาการแบบ GTRGAMMA และทำการทดสอบความเชื่อมั่นของ Clade โดยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Bootstrapping analysis จำนวน 1,000 ซ้ำ

ผล

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน กลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวย โดยวิธีวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood ภายใต้โมเดลทางวิวัฒนาการแบบ Generalised time-reversible (GTR) พบว่าเชื้อไวรัสจัดแบ่งได้เป็น 2 clades ได้แก่ clade S พบ 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วย กลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวย และ clade L พบ 6 ตัวอย่าง ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาสามารถจำแนกเชื้อไวรัสได้เป็น 2 clades ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ภายในกลุ่มอย่างชัดเจน ทำให้ทราบว่าเชื้อไวรัสที่กระจายอยู่ในประเทศไทยในกลุ่มผู้ป่วยสถานบันเทิงและสนามมวยมีความสัมพันธ์กัน และมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในรูปแบบ sister lineage ที่ระบาดในเกาหลีใต้และฮ่องกง โดยมีสายพันธุ์ที่มาจากประเทศสเปนและเม็กซิโกใกล้เคียงรองลงมาในรูปแบบ basal lineage ดังแสดงในภาพที่ 1 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวยมีความแตกต่างจากจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เดินทางมาจากประเทศจีนในช่วงแรกของการระบาดใน clade L ซึ่งเป็นศูนย์กลางการระบาดของเชื้อในประเทศจีน



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจีโนมของไวรัส SARS-CoV-2 โดยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ค่า bootstrap ที่ 1,000 replications

ความเหมือนของข้อมูลจีโนมของเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม พบมีความใกล้เคียงกันมากโดยเฉพาะจากกลุ่มสถาบันบันเทิง (S) และกลุ่มสนามมวย (S) มีความใกล้เคียงกัน 100% และระหว่างกลุ่มสถานบันเทิง สนามมวย (S) และผู้ที่เดินทางมาจากจีน (L) มีค่าเท่ากับ 99.99% นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมพบว่าเกิดรูปแบบความแตกต่าง 9 ตำแหน่ง ประกอบด้วยตำแหน่งที่ 841(A/G), 2888(C/T), 4336(G/T), 8728(C/T), 9544(C/T), 20080(T/A), 23993(A/G), 27823(G/T) และ 28090(C/T) ดังแสดงในภาพที่ 2

Consensus Variants	1	2,500	5,000	7,500	10,000	12,500	15,000	17,500	20,000	22,500	25,000	27,500	29,816
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_2472/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_2472/2020_(S) 2	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2489/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2489/2020_(S) 2	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Nakhonnayok_2829/2020	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2420/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Phatumthani_2980/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2488/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2504/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2492/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_168/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/Bangkok_323/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/Phuket_247/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/61/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/74/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_68/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT

ภาพที่ 2 ค่า Consensus Variant จากผู้ป่วยกลุ่มสถานบันเทิง สนามมวย (S) และผู้ที่เดินทางมาจากจีน (L) มีความแตกต่างกันของลำดับพันธุกรรม 9 ตำแหน่ง ประกอบด้วยตำแหน่งที่ 841(A/G), 2888(C/T), 4336(G/T), 8728(C/T), 9544(C/T), 20080(T/A), 23993(A/G), 27823(G/T) และ 28090(C/T)

ตารางที่ 1 รายชื่อสายพันธุ์ไวรัส SARS-CoV-2 และข้อมูลอื่นๆ ของแต่ละสายพันธุ์

Virus Name	แหล่งที่มา	Accession ID	Sample type	Genome	Lineage
				Size (nt)	(GISAID clade)
hCoV-19/Thailand/NIH-2492/2020	สถาบันเทว	EPI_ISL_430841	Oropharyngeal swab	29,911	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/NIH-2980/2020	สถาบันเทว	EPI_ISL_434707	Oropharyngeal swab	29,874	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_2472/2020	สัมผัสใกล้ชิดผู้ป่วยยืนยัน COVID ที่สนามมวย	EPI_ISL_455605	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/NIH-2489/2020	สัมผัสใกล้ชิดผู้ป่วยยืนยัน COVID ที่สนามมวย	EPI_ISL_434703	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Nakhonnayok_2829/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455587	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2420/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455604	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_2472/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455605	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2488/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455606	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2489/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455607	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2504/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455608	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/61/2020	เดินทางมาจากจีน	EPI_ISL_403962	Oropharyngeal swab	29,848	B (L)
hCoV-19/Thailand/74/2020	เดินทางมาจากจีน	EPI_ISL_403963	Oropharyngeal swab	29,859	B (L)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_168/2020	เดินทางมาจากจีน	EPI_ISL_450196	Oropharyngeal swab	29,891	B (L)
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_68/2020		EPI_ISL_447910	Oropharyngeal swab	29,891	B (L)
hCoV-19/Thailand/Phuket_247/2020		EPI_ISL_447914	Oropharyngeal swab	29,891	B (L)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_323/2020		EPI_ISL_447916	Oropharyngeal swab	29,891	B (L)

วิจารณ์

ปัจจุบันเทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS) ซึ่งเป็นการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการบ่งชี้ชนิดของเชื้ออุบัติใหม่ เช่น เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 อีกทั้งมีประโยชน์ในการติดตามการกลายพันธุ์ของเชื้อ โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิกทั้งชนิดดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ทำให้ทราบข้อมูลที่เป็นปัจจุบันซึ่งนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรค ยารักษาโรค และวัคซีนป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(10, 11)

เชื้อ SARS-CoV-2 ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 6 รูปแบบ (clade) ได้แก่ clade S, L, V, G, GH และ GR อ้างอิงตามฐานข้อมูลสากล GISAID โดยอาศัยตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม 9 ชนิด (genetic markers)⁽⁸⁾ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน กลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวย พบว่าเชื้อไวรัสที่กระจายตัวในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 clades ได้แก่ clade S ประกอบด้วย กลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวย และ clade L ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน โดยเชื้อไวรัสที่กระจายอยู่ในประเทศไทยในกลุ่มผู้ป่วยสถานบันเทิงและสนามมวยมีความสัมพันธ์กัน และมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ระบาดในเกาหลีใต้และฮ่องกง และสายพันธุ์ที่มาจากประเทศสเปนและเม็กซิโกตามลำดับ แต่มีความแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยที่เดินทางมาจากประเทศจีนในช่วงแรกของการระบาดซึ่งจัดอยู่ใน clade L ในขณะที่ในประเทศอิตาลี พบผู้ป่วย 2 รายแรก ในช่วงเดือนมกราคม 2563 ซึ่งเป็นนักท่องเที่ยว โดยเชื้อไวรัสที่พบจัดอยู่ใน clade V ในระยะต่อมา (เดือนกุมภาพันธ์) พบว่าเชื้อไวรัสที่แพร่กระจายและทำให้เกิดการติดเชื้อ คือ clade G การแพร่ระบาดในสหภาพยุโรปนี้คาดว่าเกิดจากการนำเข้าเชื้อของนักท่องเที่ยวชาวจีนที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการของโรคหรืออยู่ในสถานะที่ตรวจไม่พบเชื้อ (partially undetected)⁽¹²⁾ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mercatelli D และคณะ ซึ่งพบว่า clade G เป็นรูปแบบสายพันธุ์ที่มีความชุกสูงในยุโรปโดยการกลายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 614 (D614G) จาก Aspartic Acid (D) เป็น Glycine (G) โดยการกลายพันธุ์นี้เกิดในตำแหน่งของยีน spike protein⁽¹³⁾ การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งของยีน spike protein นี้ อาจส่งผลให้เชื้อไวรัสใช้ spike protein ในการเกาะติดกับตัวรับบนผนังเซลล์ของโฮสต์ (host angiotensin-converting enzyme 2; ACE2) ได้ดีขึ้น มีผลทำให้เชื้อมีความสามารถในการติดเชื้อเพิ่มขึ้น⁽¹⁴⁾ จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการแพร่ระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 ขึ้นกับภูมิศาสตร์⁽¹⁵⁾ และการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (asymptomatic SARS-CoV-2 infection)⁽¹⁶⁾ เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคไปในหลายพื้นที่ทั่วโลก

สรุป

การถอดรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ มีความสำคัญต่อการศึกษาวิวัฒนาการของไวรัส (Genetic evolution) ทำให้ทราบต้นกำเนิดและที่มาของเชื้อที่ระบาดในแต่ละเหตุการณ์และความเชื่อมโยงทางด้านระบาดวิทยาโมเลกุล ข้อมูลจากการศึกษาดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์ต่อการวางมาตรการควบคุม ป้องกันโรคติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 รวมถึงการพัฒนาและการเลือกใช้สายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีนขึ้นใช้ในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจทุกท่าน ที่ทุ่มเท มุ่งมั่น ตั้งใจปฏิบัติหน้าที่ เป็นกำลังสำคัญของหน่วยงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สอบสวนโรค กรมควบคุมโรค ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ในการสนับสนุนงบประมาณ

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. [online]. 2020; [cited 2020 Mar 1]; [1 screen]. Available from: URL: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
2. 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).
3. Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, Lin YY, Luo YH, Lin YT, et al. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int J Mol Sci* 2020; 21(7): 2657. (19 pages).
4. มาลินี จิตตกานต์พิชัย. ปฐมบท COVID-19. ว กรรมวิทย พ. [วารสารออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 10 เมษายน 2563]; 62(1): [5 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://drive.google.com/file/d/1qcVr-2ekz0P-utd-D8EPqL5OjAdMPTPin/view>.
5. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395(10224): 565-74.
6. Marra MA, Jones SJM, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YSN, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003; 300(5624): 1399-404.
7. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol* 2020; 81: 104260. (3 pages).
8. GISAID. Clade and lineage nomenclature. [online]. 2020; [cited 2020 Mar 1]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.gisaid.org/references/statements-clarifications/clade-and-lineage-nomenclature-aids-in-genomic-epidemiology-of-active-hcov-19-viruses/>
9. Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. [online]. 2010; [cited 2020 Apr 10]; [7 screens]. Available from: URL: https://www.phylo.org/sub_sections/portal/sc2010_paper.pdf.
10. Cleemput S, Dumon W, Fonseca V, Karim WA, Giovanetti M, Alcantara LC, et al. Genome detective coronavirus typing tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes. *Bioinformatics* 2020; 36(11): 3552-5.
11. Maurier F, Beury D, Fléchon L, Varré JS, Touzet H, Goffard A, et al. A complete protocol for whole-genome sequencing of virus from clinical samples: application to coronavirus OC43. *Virology* 2019; 531: 141-8.
12. Bartolini B, Rueca M, Gruber C, Messina F, Carletti F, Giombini E, et al. SARS-CoV-2 phylogenetic analysis, Lazio Region, Italy, February-March 2020. *Emerg Infect Dis* 2020; 26(8): 1842-5.
13. Mercatelli D, Giorgi FM. Geographic and genomic distribution of SARS-CoV-2 mutations. *Front Microbiol* 2020; 11: 1800. (13 pages).



14. Shah M, Ahmad B, Choi S, Woo HG. Sequence variation of SARS-CoV-2 spike protein may facilitate stronger interaction with ACE2 promoting high infectivity. Research Square. [online]. 2020; [cited 2020 Apr 10]; [21 screens]. Available from: URL: <https://assets.researchsquare.com/files/rs-16932/v1/manuscript.pdf>.
 15. Brufsky A. Distinct viral clades of SARS-CoV-2: implications for modeling of viral spread. J Med Virol 2020; 92: 1386-90.
 16. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection a narrative review. Ann Intern Med 2020; 173(5): 362-7.
-

SARS-CoV-2 : PUB and Boxing Stadium in Bangkok, Thailand

Pilailuk Akkapaiboon Okada¹ Siripaporn Phuygun¹ Sitthiporn Parnmen¹
Thanutsapa Thanadachakul¹ Sirichol Kala¹ Wandee Meechalard¹ Hathaikan Thanchai¹
Pakorn Piromtong¹ Warawan Wongboot¹ Ratana Tacharoenmuang¹
Sunthareeya Waicharoen¹ Malinee Chittaganpitch² Ballang Uppapong¹
and Opart Karnkawinpong³

¹National Institute of Health, ²Medical Sciences Technical Office, ³Department of Medical Sciences
Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Thailand was firstly confirmed on January 8, 2020 from the patient travelling from China, and the widespread infection of COVID-19, originally from a boxing stadium and pubs in Bangkok, has rapidly occurred in March. This study was to investigate the entire genome of SARS-CoV-2 from the two groups of patients with Thai nationality. Phylogenetic analysis was performed based on whole genome sequences of isolated SARS-CoV-2 derived from clinical samples of patients. Viral genotyping for both groups revealed that the virus infection was caused by clade S with a sister lineage to the strains from South Korea and Hong Kong and a basal lineage to the strains from Spain and Mexico. Our findings showed differences from clade L that was isolated from the Chinese patient during the initial COVID-19 outbreak in Thailand. It suggested that the genetic evolution of SARS-CoV-2 in Thailand was different from that in the epicenter of the outbreak in China.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, Phylogenetic analysis

การพัฒนาชุดน้ำยา DMSc COVID-19 real-time RT-PCR

พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์^๑ โอภาตะ^๑ วรารณ วงษ์บุตร^๑ ธนัสภา ธนเดชากุล^๑ สิริภาภรณ์ ผุยกัน^๑ สิริชล กาละ^๑ วันดี มีผลาด^๑ สุนทรียา วัชรเจริญ^๑ มลีนี จิตตกานต์พิชัย^๒ และบัลลังก์ อุปพงษ์^๑

^๑สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข สำนักรักษาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคโควิด-19 มีความสำคัญสำหรับการตรวจคัดกรองและยืนยันการติดเชื้อในผู้ป่วย ผู้สัมผัส และกลุ่มเสี่ยง เพื่อให้ผู้ติดเชื้อได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมและทันทั่วถึง จึงได้พัฒนาชุดน้ำยา DMSc COVID-19 real-time RT-PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโควิด-19 โดยตรวจยีนเป้าหมาย RdRp และ N ร่วมกับการประเมินวิธีการเตรียมสารพันธุกรรม RNA โดยวิธีให้ความร้อน และโดยน้ำยาล้างเซลล์ และประเมินน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพในปฏิกิริยา real-time RT-PCR จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Tween 20 (0.5%) Glycerol (10, 15, 20%) Dimethyl sulfoxide (10%) Bovine serum albumin (10 mg/mL) และ Triton X-100 (0.1%) พบว่าความไวในการตรวจหา ยีน RdRp และยีน N ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 50 และ 5 copies ต่อ reaction ตามลำดับ การเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรมด้วยวิธี heat และ direct lysis มีความไวร้อยละ 97.14 และ 100 และความจำเพาะร้อยละ 95.89 และ 94.52 ตามลำดับ และพบว่าน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพซึ่งประกอบด้วย Tween 20 (0.5%) และ Glycerol (15%) มีความไวและความจำเพาะในการตรวจยีนเป้าหมายร้อยละ 100 แสดงว่าชุดน้ำยา DMSc COVID-19 real-time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ร่วมกับการเตรียมตัวอย่างโดยตรงโดยไม่ผ่านกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมได้ ทำให้ช่วยลดต้นทุนการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและมีความรวดเร็วยิ่งขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมและตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 ได้

คำสำคัญ: โรคโควิด-19, เชื้อ SARS-CoV-2, เรียลไทม์ อาร์ที พีซีอาร์

Corresponding author E- mail: pilailuk.o@dmisc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 5 September 2020

Accepted: 13 September 2020

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือโรคโควิด-19 (Coronavirus Disease 2019 หรือ COVID-19) เป็นโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ถือเป็นโรคอุบัติใหม่ที่ทำให้เกิดการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) รวมถึงประเทศไทย จากรายงานสถิติผู้ติดเชื้อประจำวันโดยองค์การอนามัยโลก ณ วันที่ 14 มิถุนายน 2563 พบมียอดผู้ป่วยติดเชื้อสะสม 7,690,708 ราย และเสียชีวิต 427,630 ราย ขณะที่ในประเทศไทยพบผู้ป่วยติดเชื้อสะสมจำนวน 3,135 ราย และเสียชีวิต 58 ราย⁽¹⁾

เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 มีขนาด 60-140 นาโนเมตร หุ้มด้วยชั้นไขมัน มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว แบบสายบวก (positive single-stranded RNA) ขนาดยีน 27-32 กิโลเบส (kb) ประกอบด้วย ยีน Orf (open reading frame; Orf1a, Orf1ab), RdRp (RNA-dependent RNA polymerase gene), S (spike protein gene), E (envelope protein gene), M (membrane protein gene), N (nucleocapsid protein gene)⁽²⁾ จัดอยู่ในยีนส์เบต้าโคโรนาไวรัส (Betacoronavirus) ซึ่งเป็นยีนส์เดียวกับเชื้อ Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) และเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (Middle East Respiratory Syndrome หรือ MERS-CoV) ที่ก่อโรคระบบทางเดินหายใจ สามารถแพร่กระจายผ่านละอองฝอยของสารคัดหลั่งระบบทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อในอุจจาระและพบปนเปื้อนจากมือผู้ป่วยทำให้มีโอกาสแพร่เชื้อไปยังบุคคลอื่นได้^(3, 4)

การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคอุบัติใหม่เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองและยืนยันการติดเชื้อในผู้ป่วย ผู้สัมผัส หรือกลุ่มเสี่ยง มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่เหมาะสมและทันทั่วทั้งองค์การอนามัยโลก ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของสหรัฐอเมริกา ห้องปฏิบัติการอ้างอิงในประเทศไทยและประเทศต่างๆ ได้มีการพัฒนาเทคนิค real-time reverse transcription-PCR (real-time RT-PCR) ซึ่งปัจจุบันถือเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย เช่น ป้ายคอ (throat swab) ร่วมกับป้ายโพรงจมูก (nasopharyngeal swab) เสมหะ (sputum) ตัวอย่างอื่นๆ ที่เก็บจากระบบทางเดินหายใจ หรือจากตัวอย่างอุจจาระ^(2, 5, 6) สำหรับประเทศไทย ถือว่าเป็นประเทศลำดับต้นๆ ที่ตรวจยืนยันผู้ป่วยติดเชื้อก่อโรคโควิด-19 นอกประเทศจีน โดยการถอดรหัสสารพันธุกรรมทั้งยีนของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างผู้ป่วย 2 รายแรกด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing⁽⁷⁾ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสที่พบในผู้ป่วยข้างต้นนำมาสู่การออกแบบชุดไพรเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 สำหรับพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโควิด-19 ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว น่าเชื่อถือ มีความไวและความจำเพาะสูง⁽⁸⁾ โดยคัดเลือกยีนจำเพาะต่อเชื้อจำนวน 2 ยีน ได้แก่ ยีน N และยีน RdRp ในการตรวจวินิจฉัยนี้ได้มีการออกแบบการตรวจหา ยีน RdRp ร่วมกับยีน RNase P ของคน ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control)⁽⁹⁾ ในคราวเดียวกัน จึงสามารถตรวจหาชนิดของยีนเป้าหมายหลายชนิดไปพร้อมกัน ทำให้ประหยัดเวลาและต้นทุนในตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจระบบทางเดินหายใจโดยตรง ในการตรวจวินิจฉัยสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจทางพยาธิวิทยาที่มีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องมีการตรวจติดตามตัวควบคุมภายในซึ่งเป็นยีนของคนร่วมด้วย โดยยีนที่องค์การอนามัยโลกใช้สำหรับตรวจหาเชื้อก่อโรคไข้หวัดใหญ่จากสิ่งส่งตรวจของคน คือ ยีน RNase P ยีนนี้สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ การเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมควรตรวจพบยีน RNase P ร่วมด้วย กรณีที่ตรวจไม่พบยีน RNase P ในตัวอย่างอาจชี้ให้เห็นว่า 1) วิธีการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจไม่เหมาะสมทำให้สูญเสีย RNA หรือ RNA ถูกทำลาย 2) การเก็บตัวอย่างไม่เหมาะสม 3) การเตรียมน้ำยาสำหรับตรวจวินิจฉัยไม่เหมาะสม และ 4) น้ำยาหรือเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยไม่เหมาะสมหรืออาจมีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้เป็นต้น^(6, 9)

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีประสิทธิภาพ นอกจากต้องมีความรวดเร็ว น่าเชื่อถือ มีความไวและความจำเพาะสูงแล้ว ควรมีกระบวนการที่ปฏิบัติได้ง่าย สะดวก และต้นทุนต่ำ เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในกรณีที่เกิด

การระบาดของโรคในวงกว้าง การเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อเป้าหมายเป็นขั้นตอนขั้นต้นของการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา โดยการเตรียมสารพันธุกรรมที่เหมาะสมมีผลต่อความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์ วิธีการสกัดสารพันธุกรรม RNA จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป ซึ่งมีขั้นตอนสำคัญ คือ การทำลายโปรตีนและเอ็นไซม์ RNase ไม่ให้ย่อยสลาย RNA เป้าหมาย⁽¹⁰⁾ อย่างไรก็ตาม การใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปทั้งในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี real-time RT-PCR ซึ่งใช้อยู่ในปัจจุบันมีข้อจำกัดในการนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการเตรียมสารพันธุกรรม RNA โดยวิธีให้ความร้อน (heat) และการเตรียมสารพันธุกรรมโดยตรงด้วยน้ำยาย่อยสลายเซลล์ (direct lysis) เปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ร่วมกับการประเมินน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพ (enhancers) ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR เพื่อความรวดเร็วและประหยัดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ ลดข้อจำกัดด้านการนำเข้าทรัพยากรทางการแพทย์จากต่างประเทศ สนับสนุนการสอบสวนและการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโควิด-19 อย่างทันทั่วทั้งที่ในกรณีที่เกิดการระบาดของโรคในวงกว้าง ช่วยให้การตรวจยืนยันผู้ติดเชื้อและการเฝ้าระวังการระบาดของโรคติดเชื้อในพื้นที่เสี่ยงต่าง ๆ มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเป็นตัวอย่างระบบทางเดินหายใจส่วนบนของผู้ป่วย ผู้สัมผัส หรือกลุ่มเสี่ยงที่ส่งตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 ณ ห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างเดือนมกราคม ถึงพฤษภาคม 2563 จำนวน 108 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างป้ายคอ (throat swab) ร่วมกับตัวอย่างป้ายโพรงจมูก (nasopharyngeal swab) ใส่ในอาหารนำส่งสำหรับเชื้อไวรัส (Viral transport media; VTM) หรือ Universal transport media (UTM) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร รวมไว้ในหลอดเดียวกัน และนำส่งในสภาวะที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ภายใน 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR

ตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินและใช้เป็น “วิธีปัจจุบัน” เป็นตัวอย่างที่ผ่านการสกัดสารพันธุกรรม RNA โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin RNA virus (MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยใช้ชุดน้ำยา SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA) ซึ่งเป็นวิธีปัจจุบันที่ฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 จากตัวอย่างส่งตรวจผู้ป่วยหรือผู้สัมผัส

การเตรียมสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (genomic RNA)

1) วิธีปัจจุบัน: สกัดสารพันธุกรรม RNA ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์หรือตัวอย่างสิ่งส่งตรวจระบบทางเดินหายใจด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin RNA virus (MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) โดยแบ่งตัวอย่างใน VTM หรือ UTM ปริมาตร 200 µl และสกัดสารพันธุกรรมตามกระบวนการของชุดน้ำยาและใช้ RNA บริสุทธิ์ (purified RNA) ปริมาตร 5 µl เป็น RNA ต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา real-time RT-PCR

2) วิธีใหม่: การเตรียมสารพันธุกรรม RNA จากตัวอย่าง throat swab ร่วมกับ nasopharyngeal swab จากหลอดเดียวกัน มีดังนี้ 1) วิธีให้ความร้อน (heat) เตรียมตัวอย่างโดยแบ่งตัวอย่างใน VTM หรือ UTM ปริมาตร 200 µl จากนั้นนำไปทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์ (inactivated) โดยนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 µl ไปใช้เป็น RNA ต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา real-time RT-PCR และ 2) วิธี Direct lysis เตรียมตัวอย่างโดยแบ่งตัวอย่างใน VTM หรือ UTM ปริมาตร

200 µl จากนั้นเติมสารละลาย lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4 และ 150 mM NaCl) ปริมาตร 200 µl วางที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 µl ไปใช้เป็น RNA ต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา real-time RT-PCR

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity test)

ทดสอบความจำเพาะของ primers และ probes ที่จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง ซึ่งก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ เชื้อ MERS-CoV เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A (Influenza A virus) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ B (Influenza B virus) เชื้อโคโรนาไวรัสที่ก่อโรคในคน สายพันธุ์โอซี 43 (Human coronavirus OC43) และสายพันธุ์เอช เค ยู (Human coronavirus HKU) จำนวนเชื้อละ 3 สายพันธุ์ และเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อโควิด-19 2 รายแรกที่พบในประเทศไทย จากสิ่งส่งตรวจงานบริการหรือสอบสวนโรค ฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

การเตรียมน้ำยา real-time RT-PCR

1) วิธีปัจจุบัน: เตรียมน้ำยาทดสอบ (Master mix) ปริมาตรรวม 20 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา (reaction) จำนวน 2 ชุด ต่อตัวอย่าง โดยใช้หลอดไมโครทิวปปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาต่างๆ ลงไป ดังนี้ ชุดที่ 1 สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย RdRp และ Rnase P (duplex real-time RT-PCR) เติม primer WH-NIC IN-F และ WH-NIC IN-R ความเข้มข้น 0.8 µM primer RNase P-F และ RNase P-R ความเข้มข้น 0.8 µM probe WH-NIC IN-P และ probe Rnase P ความเข้มข้น 0.2 µM (ตารางที่ 1) และชุดที่ 2 สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย N เติม primer WH-NIC N-F และ WH-NIC N-R ความเข้มข้น 1 µM และ probe WH-NIC N-P ความเข้มข้น 0.4 µM (ตารางที่ 1) หลังจากนั้นเติม PCR reaction mix ซึ่งประกอบด้วย 2X Reaction mix (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 µl SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, USA) ปริมาตร 0.4 µl เติมสารพันธุกรรม RNA ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ปริมาตร 5 µl ต่อตัวอย่าง และเติมน้ำ DNase/RNase-free water สำหรับปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl ในแต่ละรอบของการทดสอบมีตัวควบคุมบวก (positive control) และตัวควบคุมลบ (no template control) ของแต่ละยีนเป้าหมาย จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Bio-Rad, CFX96 real-time PCR Detection System, USA) ดังนี้ ขั้นที่ 1 โปรแกรม Reverse transcription ใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที ขั้นที่ 2 โปรแกรม Pre-incubation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที (จำนวน 1 รอบ) ขั้นที่ 3 โปรแกรม Amplification ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที Annealing/Extension ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 ทั้งหมด 45 รอบ (cycles)

2) วิธีใหม่: เตรียมน้ำยาทดสอบปริมาตรรวม 20 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา จำนวน 2 ชุด ต่อตัวอย่าง โดยใช้หลอดไมโครทิวปปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาต่างๆ ลงไป ดังนี้ ชุดที่ 1 สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย RdRp และ Rnase P (duplex real-time RT-PCR) เติม primer WH-NIC IN-F และ WH-NIC IN-R ความเข้มข้น 0.8 µM primer RNase P-F และ RNase P-R ความเข้มข้น 0.8 µM probe WH-NIC IN-P และ probe Rnase P ความเข้มข้น 0.2 µM (ตารางที่ 1) และชุดที่ 2 สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย N เติม primer WH-NIC N-F และ WH-NIC N-R ความเข้มข้น 1 µM และ probe WH-NIC N-P ความเข้มข้น 0.4 µM (ตารางที่ 1) หลังจากนั้นเติม PCR reaction mix ซึ่งประกอบด้วย CAPITAL qPCR Probe Mix, 4x ปริมาตร 5 µl RTase with RNase Inhibitor, 20x ปริมาตร 1 µl เติมสารพันธุกรรม RNA ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ปริมาตร 5 µl

ต่อตัวอย่าง และเติมน้ำ DNase/RNase-free water สำหรับปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl ในแต่ละรอบของการทดสอบมีตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบของแต่ละยีนเป้าหมาย จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Bio-Rad, CFX96 real-time PCR Detection System, USA) ตามขั้นตอนเช่นเดียวกับ “วิธีปัจจุบัน”

ตารางที่ 1 Primer และ Probe ที่ใช้ในการศึกษานี้

ยีนเป้าหมาย	Primer/Probe	Sequence (5' -> 3')	Reference
RdRp	WH-NIC IN-F	CTCACCTTATGGGTTGGGATTATC	การศึกษานี้
	WH-NIC IN-R	AGTGAGGCCATAATTCTAAGCATGT	
	WH-NIC IN-P	FAM-TAAATGTGATAGAGCCATGCC-BHQ1	
N	WH-NIC N-F	CGTTTGGTGGACCCTCAGAT	การศึกษานี้
	WH-NIC N-R	CCCCACTGCGTTCTCCATT	
	WH-NIC N-P	FAM-CAACTGGCAGTAACCA- BHQ1	
RNaseP	RNaseP-F	AGATTTGGACCTGCGAGCG	9
	RNaseP-R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
	RNaseP-P	HEX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG- BHQ1	

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายโดยเติมน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพ (enhancers) จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Tween 20 (0.5%), Glycerol (10, 15, 20%), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (10%), Bovine serum albumin (BSA) (10 mg/mL) และ Triton X-100 (0.1%) ลงในน้ำยาทดสอบ (Master mix) และทำการประเมินประสิทธิภาพของปฏิกิริยา real-time RT-PCR

การวิเคราะห์ข้อมูล

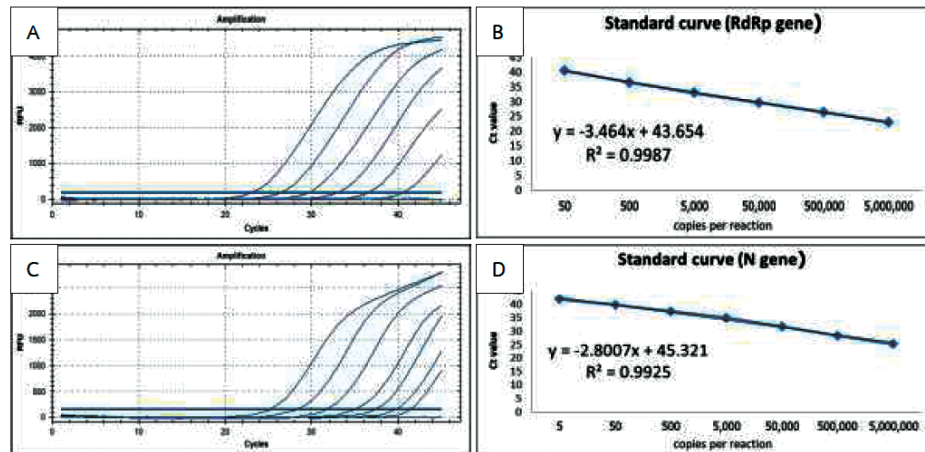
การตรวจสอบผลการพิจารณาแบบของกราฟโดยตัวอย่างที่ตรวจพบยีนเป้าหมายต้องมีกราฟในลักษณะคล้ายรูปตัวเอส (S-curve) ร่วมกับการพิจารณาค่า Cycle threshold (Ct) โดยค่า Ct ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมตามที่กำหนด ดังนี้ ยีน RdRp และ N ถ้าพบค่า Ct มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 42 รายงานผลเป็นผลบวก (detected) และยีน RNase P ถ้าพบค่า Ct มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 รายงานผลเป็นผลบวก (detected) หากตรวจไม่พบสัญญาณของสารเรืองแสง หรือค่า Ct ไม่เป็นไปตามเกณฑ์จะรายงานผลเป็นผลลบ (not detected) นอกจากนี้ ประเมินประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA ด้วยวิธี heat และ direct lysis เปรียบเทียบกับการใช้น้ำยาสำเร็จรูป และประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา enhancer ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน โดยวิเคราะห์ค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของวิธีทดสอบ⁽¹¹⁾

ผล

ความจำเพาะและความไวของวิธี real-time RT-PCR

การทดสอบความจำเพาะกับเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงซึ่งก่อโรกระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ เชื้อ MERS-CoV เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A (Influenza A virus) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ B (Influenza B virus) เชื้อโคโรนาไวรัสที่ก่อโรคในคน สายพันธุ์โอ ซี 43 (Human coronavirus OC43) และสายพันธุ์เอช เค ยู (Human coronavirus HKU) พบว่า primer และ probe ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง

ผลการทดสอบความไวของยีนเป้าหมาย RdRp และ N พบว่า ยีนเป้าหมาย RdRp และยีน N มีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 50 copies ต่อ reaction และ 5 copies ต่อ reaction ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 Amplification curve และ Standard curve แสดงความไวในการตรวจหายีน RdRp (A, B) และยีน N (C, D) ที่จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นใหม่ในสถานะที่เติม enhancer mixes (0.5% Tween 20 และ 15% Glycerol)

การประเมินประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA

ผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 108 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก 35 ตัวอย่าง และผลลบ 73 ตัวอย่างเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin RNA virus สำหรับสกัดสารพันธุกรรม และน้ำยา SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี real-time RT PCR (วิธีปัจจุบัน) พบว่าวิธี heat และ direct lysis ให้ผลบวกสอดคล้องกันร้อยละ 97.14 และ 100 ตามลำดับ และให้ผลลบสอดคล้องกันร้อยละ 95.89 และ 94.52 ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วยยีน RdRp (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาค่า Ct ผลการตรวจหายีน RdRp จากตัวอย่างที่เตรียมโดยวิธี heat และ direct lysis ข้างต้น พบว่ามีค่า Ct ต่างจากวิธีปัจจุบัน 1.63 และ 2.03 cycles ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

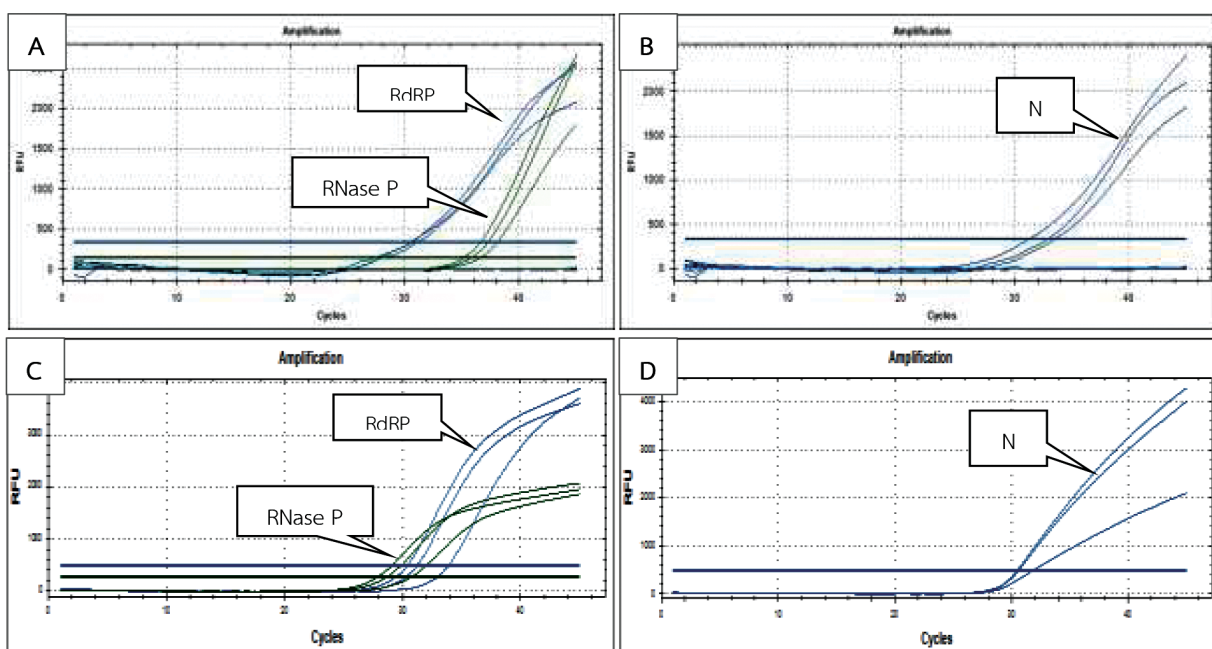
ตารางที่ 2 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA เปรียบเทียบกับน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป

วิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA/ ยีนเป้าหมาย	ค่าความไว (sensitivity) (ร้อยละ)	ค่าความจำเพาะ (specificity) (ร้อยละ)	ค่าความแตกต่างของ Ct*		
			ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
Heat					
- RdRp	97.14	95.89	0.08	8.78	1.63
- Rnase P	100	-	0.05	3.61	0.90
Direct lysis					
- RdRp	100	94.52	0.04	9.51	2.03
- RNase P	100	-	0.01	4.89	1.42

* ค่าความแตกต่างของ Ct ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการใช้น้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป

การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา enhancer ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR

ผลการทดสอบเปรียบเทียบน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Tween 20 (0.5%), Glycerol (10, 15, 20%), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (10%), Bovine serum albumin (BSA) (10 mg/mL) และ Triton X-100 (0.1 %) โดยเติมลงในน้ำยาทดสอบสำหรับส่งเสริมปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยใช้ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งมีค่า Ct ต่างๆ กันระหว่าง Ct 35.81 ถึง 42.00 รวมจำนวน 7 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ให้ผลบวก 6 ตัวอย่าง และผลลบ 1 ตัวอย่าง) ผลการตรวจหาชิ้น RdRp เมื่อเติมน้ำยา enhancer ชนิด Tween 20 (0.5%), Glycerol (10 และ 15%) และ BSA ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL พบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจยีนเป้าหมาย RdRp ร้อยละ 100 (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณา รูปแบบของกราฟและสัญญาณสารเรืองแสงที่เกิดจากปฏิกิริยา พบว่าน้ำยา enhancer ชนิด Tween 20 (0.5%) และ Glycerol (15%) ให้กราฟลักษณะคล้ายรูปตัวเอส (S-curve) และสัญญาณสารเรืองแสงสูงกว่าเมื่อเติม Glycerol (10%) และ BSA ดังนั้นจึงนำน้ำยา enhancer ชนิด Tween 20 (0.5%) และ Glycerol (15%) มาใช้ร่วมกันเป็น enhancer mixes ก่อนนำไปทดสอบประเมิน ผลการทดสอบพบว่า enhancer mixes มีค่าความไวและความจำเพาะ ในการตรวจยีนเป้าหมาย RdRp ร้อยละ 100 (ตารางที่ 3) อีกทั้งช่วยลดการเกิดผลลบปลอมและสามารถเพิ่มปริมาณ สารเรืองแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาทำให้กราฟ amplification curve มีสัญญาณสูงขึ้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 Amplification curve แสดงการตรวจหาชิ้น RdRp ร่วมกับ RNase P ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ด้วยวิธี duplex real-time RT-PCR (A, C) และยีน N (B, D) ด้วยวิธี uniplex real-time RT-PCR จากตัวอย่าง throat swab ร่วมกับ nasopharyngeal swab โดยรูป A และ B แสดงรูปสัญญาณ Amplification curve ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ในสภาวะที่ไม่ได้เติม enhancer mixes; รูป C และ D แสดงรูปสัญญาณ Amplification curve ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ในสภาวะที่เติม enhancer mixes (0.5% Tween 20 และ 15% Glycerol)

ตารางที่ 3 การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา enhancer ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR

ชนิด enhancer	ความเข้มข้น	ค่าความไว (sensitivity) (ร้อยละ)	ค่าความจำเพาะ (specificity) (ร้อยละ)	ค่าความแตกต่างของ Ct*		
				ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
Tween 20	0.5%	100	100	0.18	1.75	0.94
Glycerol	10%	100	100	0.17	2.31	0.58
	15%	100	100	0.05	2.03	0.90
	20%	86	100	0.59	1.76	1.14
DMSO	10%	75	100	0.26	0.53	0.41
BSA	10 mg/mL	100	100	0.12	0.76	0.37
Triton X-100	0.1%	75	100	0.03	3.58	0.92
Tween 20 + Glycerol	0.5% + 15%	100	100	0.04	1.00	0.52

วิจารณ์

วิธี real-time RT-PCR เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกสำหรับใช้ในการตรวจยืนยันเชื้อก่อโรคโควิด-19 การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธี real-time RT-PCR จากข้อมูลสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ถอดรหัสจากตัวอย่างผู้ป่วย 2 รายแรกในประเทศไทย⁽⁷⁾ และเปรียบเทียบกับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่พบในเมืองอุฮั่น ประเทศจีน เพื่อยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนนำมาออกแบบ primer และ probe ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย N และ RdRp⁽²⁾ โดยวิธี real-time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้แบ่งออกเป็น 2 ชุด ตามชนิดของยีนเป้าหมาย ดังนั้นชุดที่ 1 เป็นการตรวจหา ยีน N และชุดที่ 2 เป็นการตรวจหา ยีน RdRp ร่วมกับยีน Rnase P ของคน ซึ่งยีน RNase P นี้ ใช้เป็นตัวควบคุมภายในหรือตัวควบคุมกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม (internal control หรือ extraction control)⁽⁶⁾

ด้านความจำเพาะของ primer และ probe สำหรับยีน RdRp และ N ที่ใช้ในการศึกษานี้พบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ทดสอบอื่นๆ เมื่อพิจารณาความไวในการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 พบว่ายีน RdRp มีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 50 copies ต่อ reaction ขณะที่ยีน N สามารถตรวจพบที่ความเข้มข้น 5 copies ต่อ reaction การศึกษาในปี 2020 Vogels CBF และคณะได้ตรวจประเมินความไวของ primer และ probe ที่จำเพาะกับยีน RdRp พบว่ามีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่ำสุด 500 copies ต่อ reaction⁽¹²⁾ ขณะที่ Corman VM และคณะ รายงานความไวของยีน RdRp ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 3.7 copies ต่อ reaction⁽²⁾ โดยความไวในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายที่แตกต่างกันนี้ขึ้นกับการออกแบบ primer probe องค์ประกอบของน้ำยา และสถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของแต่ละยีนเป้าหมาย

การพัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรม RNA ด้วยวิธีพื้นฐาน ซึ่งมีกระบวนการที่ปฏิบัติได้ง่าย สะดวก และต้นทุนต่ำ มีความสำคัญต่อการสอบสวนหรือตรวจวินิจฉัยโรคในวงกว้าง ในการศึกษาได้พัฒนาวิธีการเตรียมสารพันธุกรรม RNA 2 วิธี ดังนี้ 1) การ heat ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ 2) การเตรียมโดยใช้ lysis buffer ซึ่งปรับปรุงวิธีจาก Shatzkes K และคณะ⁽¹³⁾ โดยใช้สายละลาย 10 mM Tris-HCl pH 7.4 และ 150 mM NaCl ปริมาตร 200 µl ต่อตัวอย่างปริมาตร 200 µl, (1:1 v/v) พบว่าวิธี heat มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 97.14 และ 95.89 ตามลำดับ ขณะที่วิธี direct lysis, enhancer mixes 5.3 µl (0.5% Tween 20, 15% glycerol)

มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 100 และ 94.52 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2014 ซึ่ง Shatzkes K และคณะ ได้พัฒนาน้ำยา lysis buffer โดยใช้หลักการของ non-ionic detergent เพื่อใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม จากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus)⁽¹³⁾ นอกจากนี้ในปี 2020 Grant PR และคณะได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จากตัวอย่าง swab ใน VTM โดยวิธีต่างๆ ได้แก่ วิธีการสกัดสารพันธุกรรม RNA การให้ความร้อน (heat) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแบบที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม โดยเติม VTM ปริมาตร 2 µl ใส่ในหลอด PCR และทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยตรง (Direct sample transfer) พบว่าวิธี Direct sample transfer มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 98 และ 100 ตามลำดับ⁽¹⁴⁾ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมสามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกในการเตรียมสารพันธุกรรม RNA เพื่อตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 โดยวิธี real-time RT-PCR ได้

การเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยา real-time RT-PCR หลังจากเติมสารพันธุกรรม RNA ลงในหลอดทดลอง โดยทั่วไปทำได้โดยเติมสารบางชนิดที่ส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาในหลอดทดลอง เช่น DMSO, BSA, Glycerol, Tween 20 และ Triton X-100 เป็นต้น การศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 1-10% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ได้ร้อยละ 33 ขณะที่ glycerol สามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ประมาณร้อยละ 5 อย่างไรก็ตามบางรายงานพบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 10% มีผลปลดประสิทธิภาพการทำงานของ DNA polymerase ร้อยละ 50⁽¹⁵⁾ จะเห็นได้ว่าการเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยา real-time RT-PCR อาจขึ้นกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงในแต่ละสภาวะ ในการศึกษาพบว่าเมื่อเติมน้ำยา enhancer mixes ซึ่งประกอบด้วย Tween 20 (0.5%) และ Glycerol (15%) ทำให้วิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยยีน RdRp มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 100 นอกจากนี้ยังมีผลช่วยลดการเกิดผลลบปลอม (false negative) และเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาทำให้กราฟ amplification curve มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

สรุป

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งก่อโรคโควิด-19 จากตัวอย่างส่งตรวจ throat swab ร่วมกับ nasopharyngeal swab ในอาหารนำส่ง VTM หรือ UTM สามารถเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรมได้โดยใช้วิธี direct lysis หรือ heat ซึ่งมีความไวร้อยละ 100 และ 97.14 และความจำเพาะร้อยละ 94.52 และ 95.89 ตามลำดับ ทำให้ช่วยลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและมีความรวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้การเติมน้ำยา enhancer mixes (0.5% Tween 20 และ 15% Glycerol) ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR ซึ่งมีความไวและความจำเพาะในการตรวจยีนเป้าหมายร้อยละ 100 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยลดการเกิดผลลบปลอมและช่วยเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ดังนั้นวิธีการเตรียมสารพันธุกรรมโดยตรงโดยไม่ผ่านกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมและการเติม enhancer mixes ที่พัฒนาควบคู่กับชุดน้ำยาตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโควิด-19 ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR (DMSc COVID-19 real-time RT-PCR) นี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ตามโรงพยาบาลและห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องตรวจทั่วประเทศ และช่วยส่งเสริมการเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคภายในประเทศให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และบริษัท สยามไบโอไซเอนซ์ ในการสนับสนุนงบประมาณและน้ำยาทดสอบเพื่อใช้ในการพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ช่วยจัดเตรียมน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่ และบุคลากรฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจทุกท่านที่ทุ่มเท มุ่งมั่น ทำให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) situation report – 146: data as received by WHO from national authorities by 10:00 CEST, 14 June 2020. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 14]; [17 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200614-covid-19-sitrep-146.pdf?sfvrsn=5b89bdad_6.
2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25(3): 2000045. (8 pages).
3. Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, Lin YY, Luo YH, Lin YT, et al. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int J Mol Sci* 2020; 21(7): 2657. (19 pages).
4. Chittaganpich M. COVID-19. *Bull Dept Med Sci* 2020; 62(1): 1-5.
5. Chen Y, Chen L, Deng Q, Zhang G, Wu K, Ni L, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J Med Virol* 2020; 92(7): 833-40.
6. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. [online]. 2020; [cited 2020 May 15]; [59 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
7. 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).
8. Johnson G, Nolan T, Bustin SA. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *Methods Mol Biol* 2013; 943: 1-16.
9. World Health Organization. real-time RT-PCR protocol for the detection of avian influenza A(H7N9) virus. [online]. 2013; [cited 2020 May 15]; [6 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_realtime_rt_pcr_protocol_a_h7n9.pdf.
10. Harada S. DNA and RNA extractions from mammalian samples. In: Micic M. Sample preparation techniques for soil, plant, and animal samples. New York: Springer Science Business Media; 2016. p. 125-138.
11. Van Stralen KJ, Stel VS, Reitsma JB, Dekker FW, Zoccali C, Jager KJ. Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. *Kidney Int* 2009; 75(12): 1257-63.
12. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-COV-2 qRT-PCR primer-probe sets. *medRxiv*. [serial online]. 2020; [cited 2020 May 15]; XX(XX): [20 screens]. Available from: URL: <https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2020/04/26/2020.03.30.20048108.full.pdf>.
13. Shatzkes K, Teferedegne B, Murata H. A simple, inexpensive method for preparing cell lysates suitable for downstream reverse transcription quantitative PCR. *Sci Rep* 2014; 4: 4659. (7 pages).

14. Grant PR, Turner MA, Shin GY, Nastouli E, Levett LJ. Extraction-free COVID-19 (SARS-CoV-2) diagnosis by RT-PCR to increase capacity for national testing programmes during a pandemic. bioRxiv. [serial online]. 2020; [cited 2020 May 15]; XX(XX): [6 screens]. Available from: URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.06.028316v1.full.pdf>.
15. Montgomery JL, Wittwer CT. Influence of PCR reagents on DNA polymerase extension rates measured on real-time PCR Instruments. Clin Chem 2014; 60(2): 334-40.

Development of DMSc COVID-19 real-time RT-PCR

**Pilailuk Akkapaiboon Okada¹ Warawan Wongboot¹ Thanutsapa Thanadachakul¹
Siripaporn Puygun¹ Sirichol Kala¹ Wandee Meechalard¹ Sunthareeya Waichroen¹
Malinee Chittaganpitch² and Ballang Uppapong¹**

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

ABSTRACT Development of diagnostic tests for detection of emerging infectious agents in patients, contact cases and high-risk group is critical for disease control and early effective treatment. In this study, we aimed to develop DMSc COVID-19 real-time RT-PCR assay for detection of RdRp and N gene which are specific for SARS-CoV-2 causing COVID-19, to evaluate a simplified extraction-free methods (heat and direct lysis) and to evaluate effects of five enhancers; Tween 20 (0.5%), Glycerol (10, 15, 20%), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (10%), Bovine serum albumin (BSA) (10 mg/mL) and Triton X-100 (0.1%) on amplification efficiency. The results demonstrated that the real-time RT-PCR assay had analytical sensitivity to detect RdRp and N gene at 50 and 5 virus copies per reaction, respectively. Among extraction-free methods, heat and direct lysis showed diagnostic sensitivity of 97.14 and 100% and specificity of 95.89 and 94.52% respectively. Enhancer mixes composed of Tween 20 (0.5%) and Glycerol (15%) increased diagnostic sensitivity and specificity up to 100%. Our study revealed that the DMSc COVID-19 real-time RT-PCR assay could be used to amplify RNA without extraction process. This assay could serve as a rapid and cost-effective diagnostic method to increase capacity of COVID-19 detection for monitoring and diagnostic purposes.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, real-time RT-PCR

Cloning and Expression of Human Monoclonal Antibody with Potent Binding to 2019 Novel Coronavirus

Apichai Prachasuphap Kodcharad Jongpitisub Nalinee Saengtong Pantida Treeyoung Porntip Chaiya and Panadda Dhepakson

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

ABSTRACT Coronavirus disease 2019 or COVID-19 is an infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Currently, there is no vaccine or specific medication to prevent and treatment of the infection. Human monoclonal antibody (mAb) CR3022 has been shown to specifically bind to SARS-CoV and cross react to SARS-CoV-2 with high affinity. We therefore construct and produce mAb CR3022 by cloning and expression in mammalian cell line. Immunoglobulin genes coding for mAb CR3022 were synthesized and cloned into human IgG1 Fc expression vector, then transfected into HEK293 cells. The expressed mAb CR3022 was harvested and purified. The obtained yield of purified mAb CR3022 was 16.5 mg/L of culture. The purified mAb CR3022 could bind to recombinant SARS-CoV-2 spike RBD with an affinity constant of 24.6 nM as determined by biolayer interferometry (BLI) binding assays. These indicated that the mAb CR3022 has the potential to be developed as diagnostic and therapeutic agents.

Keywords: Coronavirus, Monoclonal antibody, COVID-19, CR3022, SARS-CoV-2

Corresponding author E- mail: apichai.p@dmisc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 21 August 2020

Accepted: 25 August 2020

Introduction

The 2019 novel corona virus (2019-nCoV)⁽¹⁾ or Severe acute respiratory syndrome virus 2 (SARS-CoV-2)⁽²⁾ is causing an outbreak of coronavirus disease 2019 or COVID-19 that was first reported in December 2019 in Wuhan city, Hubei province, China. Subsequently, the virus has been spread all over the world.^(3, 4, 5) As of 22 June, 2020, WHO reported more than 9.2 million confirmed cases and 479,133 death in 216 countries around the world.⁽⁶⁾ This pandemic situation has forced scientists to revise strategies to fight an infectious disease through drugs, treatment, and control measures. Currently, various diagnostic test kits are available, and repurposing therapeutics has shown to be clinically effective. However, the global demand for diagnostic and therapeutic agents continues to rise, it is important to rapidly develop various algorithms to successfully identify and control the virus.⁽⁷⁾

SARS-CoV-2 is classified into the family Coronaviridae, genus *Betacoronavirus* in which SARS-CoV and MERS-CoV are. These coronaviruses are enveloped, positive-sense single-stranded RNA virus. The viral genome sequences of SARS-CoV-2 consist of 29,891 bases and shares 79.6% sequence identity to SARS-CoV.⁽⁸⁾ It encodes four structural proteins, Nucleocapsid (N) protein, Membrane (M) protein, Spike (S) protein and Envelop (E) protein and several non-structural proteins (nsp). Spike protein is the major surface antigen consists of S1 and S2 subunits. The S1 subunit contains a receptor binding domain (RBD), which is responsible for recognizing and binding to the cell surface receptor while the S2 subunit contains other basic elements needed for the membrane fusion. This facilitates viral entry into the host cell by attaching to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) receptors that is found on the surface of many human cells.^(9, 10) Therefore, spike protein is the main target for neutralizing antibodies and vaccines.⁽¹¹⁾ As the sequence similarity between SARS-CoV-2 and SARS-CoV, it raises the possibility that cross-reactive epitopes may exist.⁽¹²⁾

The CR3022 antibody has previously been generated by the screening of an antibody-phage library derived from lymphocytes of a convalescent SARS patient. This antibody is shown to neutralize SARS-CoV by targeting the receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV^(12, 13) and potently binds to SARS-CoV-2 with high affinity but is not tight enough to neutralize and stop infection.⁽¹⁴⁾ However, CR3022 antibody can synergize with other SARS-CoV-2 RBD-targeted monoclonal antibodies for neutralization and remains under investigation.⁽¹⁵⁾ We, therefore, constructed CR3022 antibody and expressed as scFv-Fc human IgG1 molecule in mammalian cell to facilitate development of effective antiviral therapeutic and diagnostic agents.

Materials and Methods

Construction of CR3022 antibody expression plasmid

Mammalian expression vector was constructed by inserting a human IgG1 Fc portion and signal sequence into plasmid pcDNA3.4 vector (Thermo Fisher Scientific, USA). Genes encoding

human immunoglobulin gamma-1 consists of C_H2 and C_H3 constant domain according to the UniProt, accession number P01857, were designed to link with secretory signal through a hinge region. The sequences were codon optimized and synthesized by GenScript Inc., USA and then cloned into pcDNA3.4 vector. The engineered vector can be used to insert immunoglobulin variable domain at cloning sites, which is between secretory signal and constant domain by blunt-end cloning and it was designated as pcDNA3.4-hIgG1Fc (Figure 1). The immunoglobulin variable heavy (VH) and light (VL) chain genes of CR3022 antibody were retrieved from the GenBank, accession numbers ABA54613.1 and ABA54614.1, respectively. They were designed as single-chain variable fragment (scFv) consists of VH and VL domains which were linked by a flexible (Gly₄Ser)₃ linker. The scFv sequences were codon optimized and synthesized by Gene Universal Inc., USA. These synthetic sequences were PCR amplified by using Q5 DNA polymerase (New England Biolabs, USA) with phosphorylated primers and then inserted into the constructed human IgG1 Fc expression vector by blunt-end ligation and transformed into *E. coli* TOP10. The presence of correct insert orientation was verified by colony PCR using CMV forward primer which was specific to the vector at upstream of the insert and CR3022 scFv reverse primer which was specific to the downstream of the insert. The positive recombinant clones were confirmed by DNA sequencing using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) on ABI PRISM® 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA).

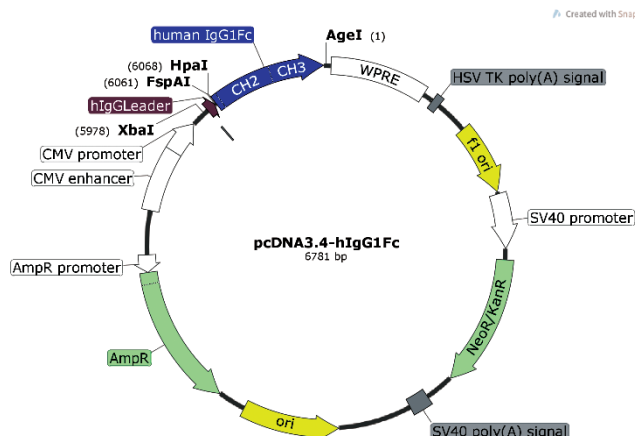


Figure 1 Genetic map of human IgG1 Fc encoding vector. The vector was linearized by double digestion with *FspAI*/*HpaI* restriction enzymes (Thermo Fisher Scientific, USA) and followed by dephosphorylation with calf intestinal alkaline phosphatase (New England Biolabs, USA) to prevent self-ligation of the vector. The linearized vector was allowed for rapid cloning with PCR product containing immunoglobulin variable gene for expression in mammalian cells.

Expression and purification of CR3022 antibody

Recombinant CR3022 scFv-Fc antibody was transiently expressed by transfecting FreeStyle™ 293-F cell (Thermo Fisher Scientific, USA) which was derived from HEK293

cell line and adapted in suspension culture. Briefly, the cells were cultured in a disposable Erlenmeyer flask with serum-free medium FreeStyle™ 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, USA) at 37°C with an orbital shaking at 125 rpm in 8% CO₂ incubator. The culture at an appropriate cell density were transfected with recombinant plasmid by using FectoPRO® transfection reagent (Polyplus-transfection®, France) at the ratio of 1 µg plasmid DNA to 1.5 µL of FectoPRO® transfection reagent according to the manufacturer's protocol. Culture supernatants were harvested 5 days post transfection and antibody was purified from culture supernatant by using Protein G Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare, USA). The column was packed with Protein G resin and equilibrated with binding buffer containing 20 mM NaHPO₄ pH 7.0. The culture supernatant was applied through the column and washed with binding buffer. The bounded antibody was eluted by using 0.1 M citric acid pH 3.0, and neutralized immediately by using 1.0 M Tris pH 9.0 and then dialyzed against Phosphate Buffered Saline (PBS). The purified antibody was concentrated using an Amicon® Ultra Centrifugal Filters device with a 30 kDa molecular weight cutoff (Merck Millipore, USA) and the concentration was determined by BCA protein assay using BSA as standard protein. The purity was checked by SDS-PAGE and subsequently stained with PageBlue™ protein staining solution (Thermo Fisher Scientific, USA). Western blot analysis was performed after transferring the protein on to a nitrocellulose membrane with polyclonal rabbit anti-human IgG/HRP (Agilent Dako, USA) and followed by TMB substrates (Seracare Life Sciences, USA) color development.

Recombinant SARS-CoV-2 Spike RBD

pcDNA3.4-2019nCoV-RBD was previously constructed. Briefly, the gene encoding RBD (residue 319–541) of 2019-nCoV was amplified from plasmid pCMV3-2019-nCoV-S1 (Sinibiological, China) by PCR using specific primers to introduce the Kozak consensus sequence included Secrecon signal sequences and restriction sites of *HindIII* and *BamHI*. The PCR product was ligated into modified pcDNA3.4 vector containing C-terminal FLAG Tag. The obtained recombinant vector pcDNA3.4-2019nCoV-RBD was then transfected into FreeStyle™ 293-F cells (Thermo Fisher Scientific, USA) as previously described and cultured at 37°C with an orbital shaking at 125 rpm in 8% CO₂ incubator for 3 days. The expressed protein was purified from culture supernatant by Anti-DYKDDDDK G1 Affinity Resin (Genscript®, USA), washed with wash buffer [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4] and eluted with alkaline elution buffer [0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 12.0], then neutralized with 1M HCl. The purified fractions were dialyzed against PBS and concentrated using an Amicon® Ultra Centrifugal Filter device with a 10 kDa molecular weight cutoff (Merck Millipore, USA) and the concentration was determined by BCA protein assay using BSA as standard protein. Protein purity was examined with SDS-PAGE and specific protein was identified by Western blot using mouse monoclonal anti-FLAG M2-HRP (Sigma-Aldrich, USA).

Analysis of CR3022 antibody binding kinetics

Biolayer interferometry (BLI) assay was performed using an Octet K2 instrument (FortéBio, USA) in order to determine the binding kinetics between the receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 and CR3022 scFv-Fc antibody. CR3022 scFv-Fc antibody was immobilized on Protein G biosensors (FortéBio, USA) at 10 µg/ml and six different concentrations (200, 100, 50, 20, 10 and 5 nM) of recombinant SARS-CoV2 spike RBD were used to analyse. The assay was performed in kinetics buffer (PBS, 0.01% BSA, 0.02% Tween 20, and 0.005% NaN_3) at 30 °C with a shake speed of 1,000 rpm. The binding profile of sample was recorded as a wavelength shift in nanometers which represented the difference between the start and the end of the kinetic cycle. Kinetic responses were analyzed using the FortéBio Data Analysis Software HT v11.1 (FortéBio, USA), with a global 1:1 fitting model to obtain values for association rate constants (k_{on}), dissociation rate constants (k_{off}), and the equilibrium dissociation constant (K_D). Curves that could not be reliably fitted with the software ($R^2 < 0.90$) were excluded from further analysis.

Results

Construction of CR3022 antibody expression plasmid

The plasmid pcDNA3.4-hIgG1Fc was successfully constructed as a human IgG1 Fc antibody expression vector. The synthetic scFv sequence encoding CR3022 antibody was amplified and a single PCR product of 742 bp in length was corresponding to the expected size of synthetic scFv sequences as shown in agarose gel electrophoresis was obtained (Figure 2). Then, the purified PCR product was ligated into pcDNA3.4-hIgG1Fc vector and subsequently transformed into competent *E. coli* TOP10 cells.

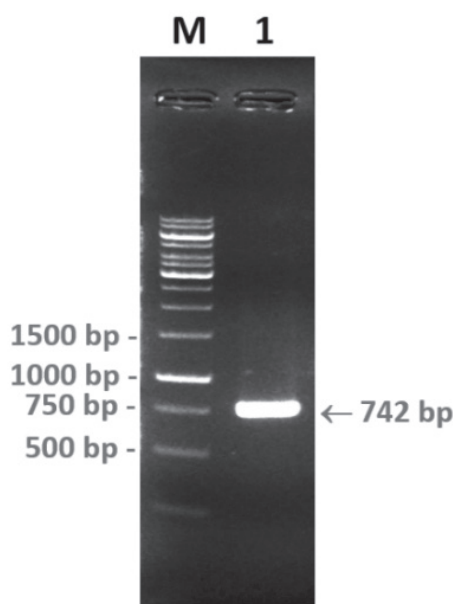


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of amplified PCR product from synthetic scFv sequences encoding CR3022 antibody. Lane M: 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), Lane 1: CR3022 scFV and DNA fragment sizes are indicated.

After transformation, 17 individual colonies were selected and analyzed for the presence of scFv by colony PCR. Two positive clones with 965 bp insert corresponding to the expected size of CR3022 scFv were shown on agarose gel electrophoresis (Figure 3). Sequencing results confirmed that only one of the two positive clones had correct orientation insert of CR3022 scFv in the pcDNA3.4-hIgG1Fc vector (data not shown).

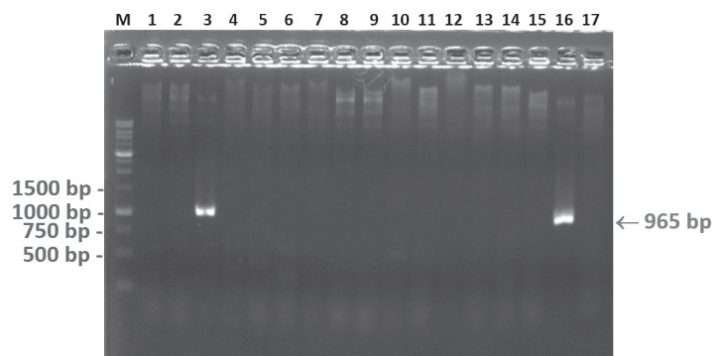


Figure 3 Agarose gel electrophoresis of colony PCR amplified products from transformant colonies. Lane M: 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), lane 1-17: amplification product of each transformant colonies respectively, and DNA fragment sizes are indicated. Corresponding bands of 965 bp were found on lane 3 and 16, indicating positive clones.

Expression and purification of CR3022 antibody

CR3022 antibody was successfully expressed in the format of scFv-Fc from transiently transfected HEK293 cells with recombinant pcDNA3.4-hIgG1Fc-CR3022scFv plasmid which was secreted into the culture supernatant. The expressed antibody was achieved purification via Protein G affinity chromatography. The purification and dialysis process resulted in the yield of about 16.5 mg of purified antibody from 1 L of transfected culture. The purified antibody

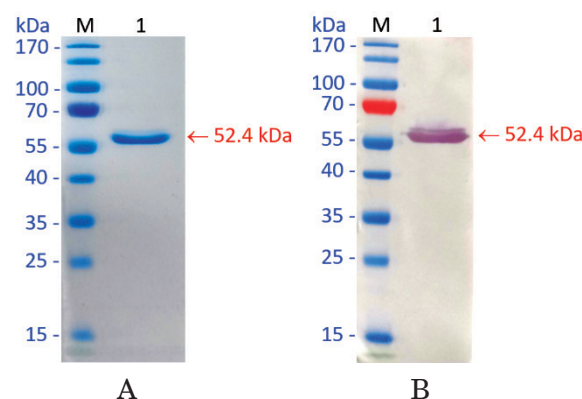


Figure 4 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified CR3022 scFv-FcIgG antibody. (A) The purified antibody was separated on 12% acrylamide gel under reduced condition. (B) Western-blot analysis with polyclonal antibody specific to human IgG. Lane M: Protein ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), Lane 1: purified CR3022 scFv-FcIgG antibody and molecular weight were indicated.

appeared as a single protein band on SDS-PAGE which was slightly larger than the predicted molecular weight of 52.4 kDa based on calculation from amino acid sequences. This was due to the glycosylation process. The expressed protein could react with anti-human IgG antibody as shown by Western blot analysis (Figure 4).

Recombinant SARS-CoV-2 Spike RBD

The recombinant SARS-CoV-2 Spike RBD protein was expressed as soluble protein and mainly secreted into the culture supernatant. The purification yield obtained from anti-DYKDDDDK affinity chromatography was 11.7 mg/L of culture. The SDS-PAGE of protein obtained from the chromatography showed a single protein band which was slightly larger than the predicted molecular weight of 26.41 kDa based on calculation from amino acid sequences. This was due to the glycosylation process. The expressed protein could react with anti-FLAG antibody which was specific to the fusion tag of the protein as shown by Western blot analysis (Figure 5).

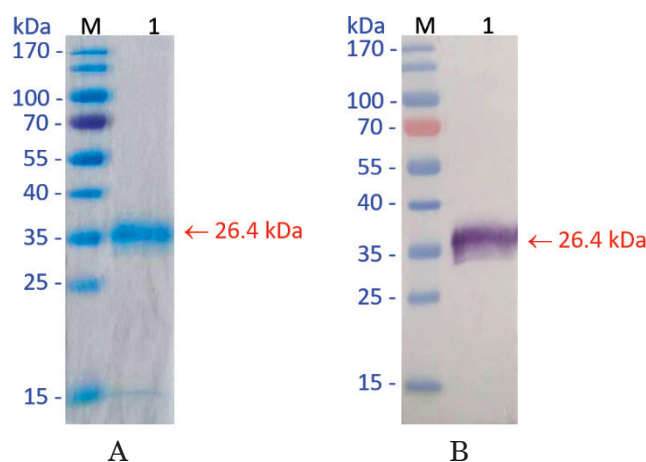


Figure 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified Recombinant SARS-CoV-2 Spike RBD protein. (A) The purified protein was separated on 12% acrylamide gel under reduced condition. (B) Western-blot analysis with monoclonal antibody specific to FLAG tag of the protein. Lane M: Protein ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), Lane 1: purified Recombinant SARS-CoV-2 Spike RBD protein and molecular weights were indicated.

Analysis of CR3022 antibody binding kinetics

The CR3022 scFv-FcIgG1 was shown to bind potently with recombinant SARS-CoV-2 spike RBD as determined by BLI (Figure 6). The processed data were obtained as an association rate constant (K_{on}) of $2.60 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ and dissociation rate constant (k_{off}) of $6.39 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, resulting in an equilibrium binding constants (K_D) of 24.6 nM with an R^2 values greater than 0.97.

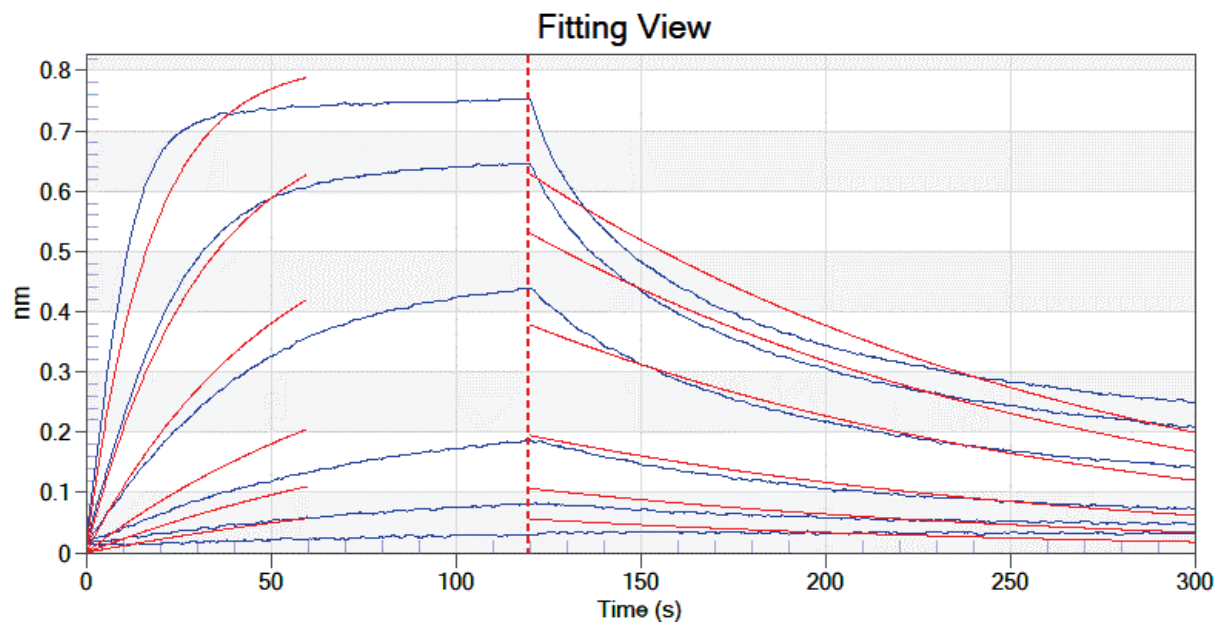


Figure 6 Binding sensorgrams of CR3022 scFv-FcIgG1 antibody interacting with recombinant SARS-CoV-2 spike RBD measured by BLI in Octet K2. Applied analyte concentrations were: 200, 100, 50, 20, 10 and 5 nM. The fit curves were indicated by the red lines, whereas the sensorgrams were shown in blue lines. Binding kinetics was evaluated using a global 1:1 fitting model with FortéBio Data Analysis Software HT v11.1.

Discussion

The results showed that our human IgG1 Fc antibody expression vector could be expressed as secreted scFv-Fc form of CR3022 antibody in HEK293 cell lines. Although, various recombinant antibody expression vectors have been developed and commercialized, a custom vector with signal sequence and optimized human codon usage for higher secreted antibody yield is still required.^(16, 17, 18) The most important benefit is to facilitate cloning of several different antibody encoding sequences at a cost-effective timeframe. The original CR3022 antibody was obtained in scFv format by screening from phage display library,^(12, 13) which the VH and VL coding sequences were genetically linked in a single transcript and no need to balance the expression of the heavy chain (HC) and light chain (LC). This allows fast production of scFv antibody, in higher yields, and lower costs than full-length IgG antibody in mammalian expression systems.⁽¹⁹⁾ However, an antibody in scFv format retains only the antigen binding activities without Fc mediated effector function, resulting in limitation to be used as therapeutic agents.^(20, 21, 22) In order to overcome this drawback, we engineered the CR3022 antibody by fusing scFv with the human IgG1 Fc domain to increase their therapeutic potential. The scFv-Fc format allows for rapid characterization of candidate scFv antibody before conversion into a full-length IgG and offers several advantages over scFv antibody, including bivalent binding, longer half-life, and Fc-mediated effector functions.⁽²³⁾

Expression of CR3022 scFv-Fc antibody was performed in transiently transfected HEK 293 cells in order to obtain higher yields in combination with simple and robust protocols for production and downstream processing. Human embryonic kidney (HEK) 293 cell lines have been used for transient protein expression because they can be very efficiently transfected with plasmid DNA.⁽²⁴⁾ Transient mammalian antibody expression is much more suitable for small scale production because it allows rapid production without generating stable cell lines⁽²⁵⁾. Moreover, it can be scaled up by using bioreactor processes to more than 150 liter production volumes.⁽²⁶⁾

The engineered CR3022 antibody in scFv-Fc format in this study could bind potently to the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 as well as original scFv construct, as previously reported⁽¹³⁾ while the absolute kinetic values could also vary due to different materials and experiment conditions.⁽²⁷⁾ Although CR3022 scFv-Fc antibody itself could not neutralize SARS-CoV-2 in an in vitro microneutralization assay (data not shown) as previously reported, it could be combined with other SARS-CoV-2 RBD-targeted monoclonal antibodies for synergistic effect on neutralizing activity.^(12, 13) Moreover, engineered Fc variants of CR3022 antibody could be optimized for effector function which will be able to reduce the viral replication in an in vivo assay.⁽¹⁴⁾

The results indicated that CR3022 antibody has the potential for further development as therapeutic and diagnostic agents for treatment and control of 2019 coronavirus infections.

Conclusion

Recombinant human monoclonal antibody CR3022 was successfully generated in scFv-Fc format and could be produced by transiently expressed in HEK 293 cell lines. The expressed antibody was predominantly secreted into the culture medium as a result of the leader signal introduced in the constructed human IgG1 Fc vector. The purification could be achieved by protein G affinity chromatography. This recombinant antibody has been proven to bind potently with recombinant SARS-CoV-2 spike RBD.

Acknowledgements

We would like to thank Director of Institute of Biological Products and Director of Medical Life Sciences Institute for continuous support throughout this work. We were highly acknowledged to Nation Institute of Health for providing DNA sequencer facility. This study was a part of a grant from National Vaccine Institute, Department of Disease Control (Contract No. 2563.1/7).

References

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Novel coronavirus 2019 (nCoV-2019), Wuhan, China. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 6]; [2 screens]. Available from: URL: <https://web.archive.org/web/20200114084712/https://www.cdc.gov/coronavirus/novel-coronavirus-2019.html>.

2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 6]; [20 screens]. Available from: URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.937862v1.full.pdf>.
3. Illinois Department of Public Health. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): frequently asked questions. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 6]; [9 screens]. Available from: URL: <https://www.dph.illinois.gov/topics-services/diseases-and-conditions/diseases-a-z-list/coronavirus/faq>.
4. Yang CL, Qiu X, Zeng YK, Jiang M, Fan HR, Zhang ZM. Coronavirus disease 2019: a clinical review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24(8): 4585–96.
5. Singhal T. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr* 2020; 87(4): 281–6.
6. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) situation reports-157. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 26]; [17 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200625-covid-19-sitrep-157.pdf?sfvrsn=423f4a82_2.
7. Lyer M, Jayaramayya K, Subramaniam MD, Lee SB, Dayem AA, Cho S, et al. COVID-19: an update on diagnostic and therapeutic approaches. *BMB Rep* 2020; 53(4): 191–205.
8. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579(7798): 270–3.
9. Boopathi S, Poma AB, Kolandaivel P. Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. *J Biomol Struct Dyn*. [serial online]. 2020; [cited 2020 Jun 6]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/07391102.2020.1758788>.
10. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181(2): 271–80.
11. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV -- a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(3): 226–36.
12. Yuan M, Wu NC, Zhu X, Lee CCD, So RTY, Lv H, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 2020; 368(6491): 630–3.
13. Tian X, Li C, Huang A, Xia S, Lu S, Shi Z, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9(1): 382–5.
14. Atyeo C, Slein MD, Fischinger S, Burke J, Schafer A, Leist SR, et al. Therapeutic potential of SARS-CoV-2-Specific monoclonal antibody CR3022. *SSRN Electron J*. [serial online] 2020; [cited 2020 Jun 6]; [15 screens]. Available from: URL: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3612156.
15. ter Meulen J, van den Brink EN, Poon LLM, Marissen WE, Leung CSW, Cox F, et al. Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants. *PLoS Med* 2006; 3(7): e237. (9 pages).



16. Ho SCL, Tong YW, Yang Y. Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines. *Pharm Bioprocess* 2013; 1(1): 71-87.
17. Hung F, Deng L, Ravnikar P, Condon R, Li B, Do L, et al. mRNA stability and antibody production in CHO cells: improvement through gene optimization. *Biotechnol J* 2010; 5(4): 393-401.
18. Kalwy S, Rance J, Young R. Toward more efficient protein expression: keep the message simple. *Mol Biotechnol* 2006; 34(2): 151-6.
19. Bates A, Power CA. David vs. Goliath: the structure, function, and clinical prospects of antibody fragments. *Antibodies (Basel)* 2019; 8(2): 28. (31 pages).
20. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 980250. (15 pages).
21. Zhang H. Empowering scFv with effector cell functions for improved anticancer therapeutics. *Oncoimmunology* 2013; 2(6): e24439. (2 pages).
22. Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol* 2013; 4: 217. (20 pages).
23. Bujak E, Matasci M, Neri D, Wulhfard S. Reformatting of scFv antibodies into the scFv-Fc format and their downstream purification. *Methods Mol Biol* 2014; 1131: 315-34.
24. Jäger V, Büssow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A, et al. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* 2013; 13: 52. (20 pages).
25. Geisse S, Fux C. Recombinant protein production by transient gene transfer into mammalian cells. *Methods Enzymol* 2009; 463: 223-38.
26. Baldi L, Hacker DL, Adam M, Wurm FM. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol Lett* 2007; 29(5): 677-84.
27. Neuber T, Frese K, Jaehrling J, Jäger S, Daubert D, Felderer K, et al. Characterization and screening of IgG binding to the neonatal Fc receptor. *mAbs* 2014; 6(4): 928-42.

การโคลนและการแสดงออกโมโนโคลนอลแอนติบอดี ของมนุษย์ที่มีศักยภาพในการจับกับไวรัสโคโรนา สายพันธุ์ใหม่ 2019

อภิชัย ประชาสุภาพ กชรัตน์ จงปิตร์พิชัย นลินี แสงทอง พันธุ์ธิดา ดริยวง พรทิพย์ ไชยยะ
และปณิดา เทพอัศธร

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือ COVID-19 เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกัน หรือการรักษาที่เฉพาะเจาะจง โมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ CR3022 สามารถจับกับเชื้อไวรัส SARS-CoV ได้อย่างจำเพาะและเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยปฏิสัมพันธ์สูง การศึกษานี้ได้สร้างและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ CR3022 ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยการสังเคราะห์ยีนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี CR3022 และโคลนเข้าสู่พาหะสำหรับแสดงออกแอนติบอดี IgG1 ของแอนติบอดีมนุษย์ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากนั้น transfection เข้าสู่เซลล์ HEK 293 จากการแสดงออกสามารถแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดี CR3022 ให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 16.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากทำให้มีความบริสุทธิ์แล้วสามารถจับกับโปรตีนลูกผสมส่วน spike RBD ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ได้โดยมีค่าคงที่ของปฏิสัมพันธ์ (K_D) เท่ากับ 24.6 nM โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Biolayer interferometry (BLI) แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี CR3022 ที่ผลิตขึ้นนี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาการตรวจวินิจฉัย และแอนติบอดีเพื่อการรักษาได้

คำสำคัญ: ไวรัสโคโรนา, โมโนโคลนอลแอนติบอดี, COVID-19, CR3022, SARS-CoV-2

Development and Evaluation of A Rapid Test for SARS-CoV-2 IgM/IgG Detection by Immunochromatography

**Panadda Dhepakson Anicha Luengchaichawang Apichai Prachasuphap
Sakulrat Soonthornchatrawat Kodcharad Jongpitisub Porntip Chaiya
Kaveewan Mongkolsiri Pantida Treeyoung Naline Saengtong Parnuphan Panyajai
Lapasrada Mungmongkol Kritsamon Sophondilok and Archawin Rojanawiwat**
Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The emerging of new coronavirus, SARS-CoV-2 causing COVID-19, is one of the worst pandemics in human. The viral RNA detection by using RT-PCR can indicate current and use for diagnosis of infection and case finding. Serological test can reveal previous infection and be used in multipurpose. In this study, we developed COVID-19 IgM/IgG rapid test for antibody detection in SARS-CoV-2 infection individuals. The developed test used recombinant N-protein of SARS-CoV-2 expressed in mammalian cells as gold-conjugated protein antigen and was assessed with 132 clinical samples. The results showed its sensitivity of 35.09%, 47.62% and 87.51% at 1-7, 8-14 and ≥ 15 days after onset, respectively and no cross-reactivity with other antibodies in various diseases from tested samples. In addition, the test has high specificity of 99.5%.

Keywords: SARS-CoV-2, Serological test, N-protein, Antibody detection, COVID-19 IgM/IgG Rapid test

Corresponding author E- mail: panada.d@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 25 August 2020

Accepted: 6 September 2020

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an acute respiratory disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)⁽¹⁾. The first case was reported in Wuhan, Hubei province, China in December 2019⁽²⁾ and then the number of cases were increased rapidly. This disease was uncontrollable and spreading globally^(3,4). The World Health Organization (WHO) declared the outbreak as a public health emergency of international concern on 30 January 2020⁽⁵⁾. As of 22 June 2020, over 9 million infection cases with nearly 500,000 death cases has been reported in 216 countries⁽⁶⁾. The virus can spread more rapidly than severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)⁽⁷⁾ that responsible for SARS and MERS outbreak in 2002 and 2012, respectively^(8,9). Previous study revealed COVID-19 patients, mostly have an incubation period of 3 to 7 days, maximally 14 days and the clinical characteristics are difficult to differentiate from pneumonia caused by other common respiratory tract infections^(10,11).

SARS-CoV-2 is Betacoronavirus in *Orthocoronavirinae* subfamily and Coronaviridae family shared 79.6% genome sequences identity to SARS-CoV⁽¹²⁾. It composes of structural proteins as of nucleocapsid (N) protein, membrane (M) protein, spike (S) protein, envelope (E) protein and several non-structural proteins. Among the four structural proteins, the spike (S) and the nucleocapsid (N) are the main immunogens. The S protein is the common target for neutralizing antibodies in therapeutic antibodies and vaccine development⁽¹³⁾, the N protein is the most abundant with highly conserved and immunogenic phosphoprotein often uses for diagnostic marker and potential antiviral drug target⁽¹⁴⁾.

Detection of viral RNA with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) based technique is being used as a standard test for diagnosis of current SARS-CoV-2 infection and for tracking the outbreak. However, antibodies detection, not only has clinical value of host antibody response during infection, it also has advantages to understanding the epidemiology of SARS-CoV-2 since it can identify previous infection⁽¹⁵⁾. Serosurveillance using serological testing that is faster and less workload with sufficient sensitivity and specificity is urgently needed.

The serological testing has multiple purposes. For example, it can be used for contact tracing after a suspected infection for weeks or longer, and also for epidemiological studies. Serological test can be used to verify if the vaccines work as intended in clinical trials and also can be applied in development of therapeutic antibodies⁽¹⁶⁾. Lateral flow immunochromatography, which is one of the serological tests, for IgM and IgG rapid detection is based on the principle of specificity of antibody-antigen complex. There are several formats that can be developed using this principle. In this case, immunoglobulins in a specimen bind with their antigen which is readily conjugated by gold colloidal, on membrane and flow by fluid dynamics. Consequently, the complex is fixed by immobilized capture molecule, and visible positive bands are revealed. To date, the rapid test for antibody detection is widely used for viral diseases detection including Human Immunodeficiency Virus (HIV), Hepatitis B Virus (HBV), Zika Virus (ZIKV),

depending on their specific serological markers⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. In this report, we developed and evaluated COVID-19 IgM/IgG rapid test, a serological test for detection of antibodies to N protein. Cross reactivity and stability were also studied.

Materials and Methods

Expression and Purification of N protein

Recombinant N protein of SARS-CoV-2 was expressed in mammalian cells, and then purified by affinity Chromatography⁽²⁰⁾. Briefly, FreeStyle™293-F cells (Thermo Fisher Scientific, USA) were transfected with recombinant plasmid pcDNA 3.4 : NP, expression vector pcDNA 3.4 (Thermo Fisher Scientific, USA) containing N gene encoding SARS-CoV-2 N protein tagged with FLAG® epitope, a short, hydrophilic, 8-amino acid peptide (DYKDDDDK tag) at n-terminal, using Fectopro® (Polyplus transfection, France). The transfected cell culture was incubated at 37°C and 8% CO₂ with orbital shaking at 125 rpm for 3 days, and cells were then harvested by centrifugation at 1,500x g, 10 minutes. The cell pellet was suspended in lysis buffer of 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40 and 1 mM EDTA then lysed by sonication. The supernatant was collected after centrifugation at 10,000x g and applied to Anti-DYKDDDDK G1 Affinity Resin (GenScript, USA). The unbound proteins were washed with Tris-buffered saline (TBS), pH 7.4 and the bound proteins were eluted with 0.1 M Glycine hydrochloride, pH 3.5 with neutralized by immediately adding 1 M Tris-HCl, pH 9. The eluted proteins were then dialysed in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 at 4°C overnight and finally, concentrated using Amicon Ultra-4 10 K (Merck Millipore, Germany). The obtained purified proteins were characterized by using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis using anti-DYKDDDDK tag monoclonal antibody (Anti-FLAG® mAb) (GenScript, USA) and COVID-19 patient sera as probe. The protein concentration was determined by Bicinchoninic acid (BCA) assay using BCA Protein Assay kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA).

Preparation of colloidal gold conjugated N protein

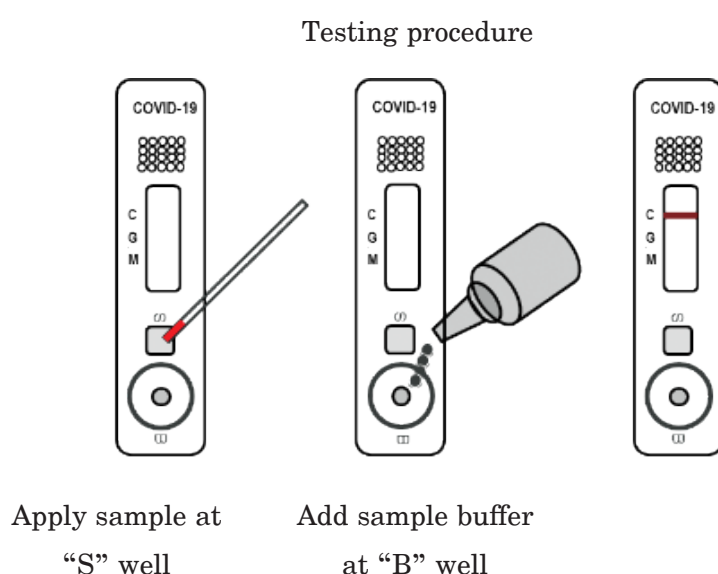
Recombinant N protein was conjugated with colloidal gold particles which mean diameter of 40 nm (DCN Diagnostics, USA) as described previously⁽²¹⁾ with some modification, Firstly, N protein was diluted to 0.1 mg/ml in 2 mM borate buffer, pH 9.0. The gold solution was adjusted to pH 9.0 with 0.2 M K₂CO₃, then mixed with the N protein at ratio 100 µg N protein: 1 ml of gold solution. The mixture was incubated for 30 minutes at room temperature with rotating, and then blocked with bovine serum albumin (DCN Diagnostics, USA) at final concentration of 1% v/v at room temperature for 30 minutes. The gold conjugated N protein was collected by centrifuge at 12,000x g for 30 minutes at 4°C. Finally, it was suspended and diluted with diluent buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.5% BSA and 0.05% NaN₃) to 20 O.D. and measured absorbance at 540 nm using spectrophotometer (Amersham Bioscience Ultraspec®3100 Pro)

Preparation of COVID-19 IgM/IgG rapid test

The COVID-19 IgM/IgG rapid test was prepared⁽²²⁾ as follows. Firstly, the reagents in PBS of 0.2 mg/ml anti-FLAG[®] mAb, 0.8 mg/ml anti-human IgG mAb, and 0.5 mg/ml anti-human IgM (Arista Biologicals, USA) were immobilized on nitrocellulose membrane (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, USA) at the control line (C), test line1 (G) and test line2 (M), respectively. Then, the membrane was dried for 2 hours at 37°C. The fiber glass-conjugated pad was prepared by treating it with 10 mM borate buffer pH 8.0 and let dried for 3 hours at 37°C. Then gold-conjugated N protein was sprayed and dried on for further use as a conjugated pad. The sample pad and absorbent pad consisted of untreated cotton fiber and absorbent material, respectively. For assembly, all pads were overlapped partially to ensure continuous flow of the sample and solution along the test strip and cut into 4 mm width strip. The test strips were kept in a plastic housing.

Procedure and interpretation results of rapid test for SARS-CoV-2 antibody detection

The testing procedure of COVID-19 rapid test was shown in Figure 1. Briefly, the sample of 10 µl serum/plasma or 20 µl of whole blood was applied to red cells captured sample pad at “S” well, then 5 drops approximately 180 µl of sample buffer (containing with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.7 and 0.5% Casein 0.1% NaN₃) was transferred onto sample pad at “B” well. The results can be read within 15 minutes. The results interpretation for all tests, the control line (C) should appear whether there is specific antibody or not. If it does not appear, the test is invalid. If the pink purple band appears at G line, the sample is positive for IgG. If the band appears at M line, the sample is positive for IgM. If the pink purple bands appear both at G and M lines, the sample is positive for both IgG and IgM (Figure 1).



Results interpretation

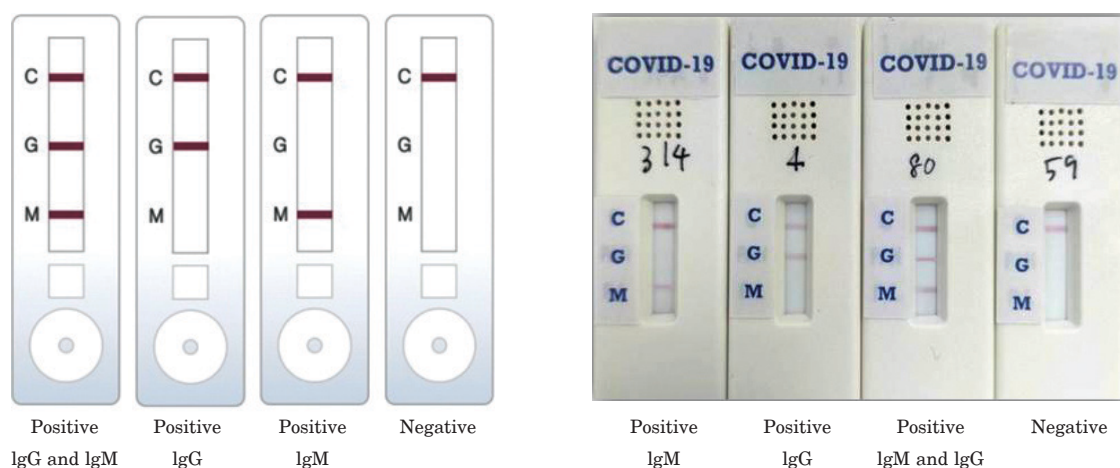


Figure 1 Procedure of testing and results interpretation of COVID-19 IgM/IgG rapid test
(A) Theoretical model of the test strip (B) Actual test strip

Evaluation of COVID-19 IgM/IgG rapid test for SARS-CoV-2 antibody detection

One hundred and thirty two sera or plasma of RT-PCR confirmed COVID-19 patients, and one hundred sera from healthy donors collected during outbreak, 100 sera of blood donors collected before outbreak were used for analysis in this study. For cross-reactivity study, the antibody positive serum samples, kindly provided by National Institute of Health, Department of Medical Sciences, consisting of 9 Measles, 9 Mumps, 2 Mycoplasma, 5 Hepatitis C Virus (HCV), 5 Human Immunodeficiency Virus (HIV), 5 Enterovirus 71 (EV71) or Coxsackievirus A 10 (CA10) or Coxsackievirus A 16 (CA16), 1 Influenza virus and 5 Autoimmune diseases, were used for evaluation of the test kit. The ethics was approved by Ethical Committee of Department of Medical Sciences in 0644/EC190 by 22 June, 2020. Table 1 was used for calculation of sensitivity, specificity, and predictive values.

Table 1 Sensitivity and specificity of calculation table

		Standard Method		
		True positive	True negative	
Test kit	Positive	a	b	a + d
	Negative	c	d	c + d
		a + c	b + d	a + b + c + d

For calculation, sensitivity = $a/(a + c)$, specificity = $d/(b + d)$, positive predictive value = $a/(a + b)$, and negative predictive value = $d/(c + d)$. When a is the number of true positive samples, b is the number of false-positives samples, c is the number of false-negative samples, and d is the number of true negative samples.

Stability study

The accelerated aging test was conducted to predict the real-time shelf life. The rapid test strips were stored in drying oven (Gemmy industrial, IN-601) at 55 °C for 32 days. The test strips were performed with the positive IgG and IgM, positive IgG, positive IgM and negative serum samples at day 3, 5, 11, 21, 23, and 32, and scored by intensity of the colored line from 0 to +3. The real-time shelf life was calculated based on ASTM F1980 Standard guide for accelerated aging of sterile barrier systems for medical devices, following the equations: Accelerated aging time duration = Real-time shelf life/Accelerated aging rate, Accelerated aging rate = $Q_{10}^{((T_E - T_A)/10)}$ where T_E is elevated temperature, T_A is ambient temperature, and Q_{10} is reaction rate which is 2 for medical devices⁽²³⁾.

Results

SARS-CoV-2 N protein expressed in mammalian cells

The purity and specificity of purified recombinant N protein expressed in mammalian cells was analyzed by using SDS-PAGE and western blot analysis. The results in Figure 2 showed the major band of protein with molecular weight of 46.9 kDa which corresponded to N protein was highly expressed and purified (Figure 2A). The specific band of the same molecular weight was observed by western blot analysis using anti-FLAG[®] mAb and COVID-19 patients serum as probe as shown in Figure 2B respectively.

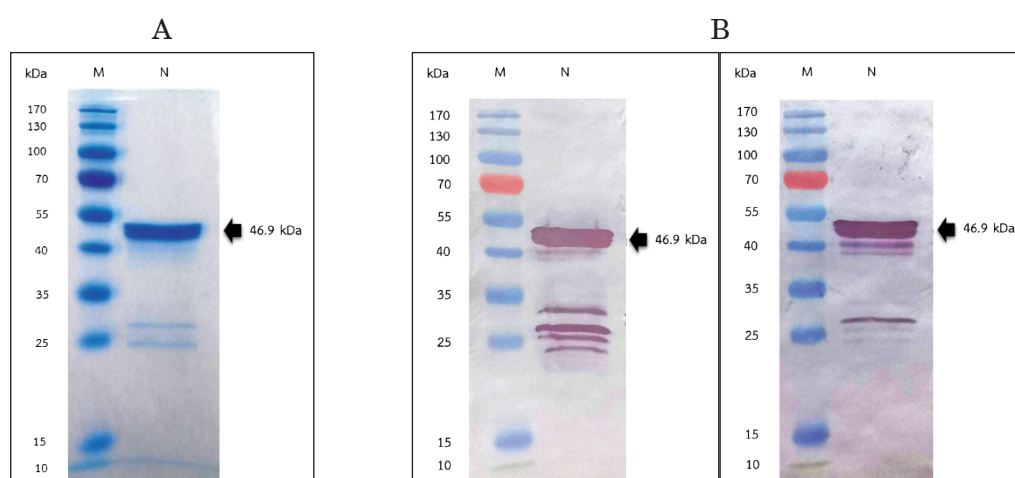


Figure 2 Characterization of purified SARS-CoV-2 N protein by SDS-PAGE (A), western blot analysis (B) probed with anti-FLAG[®] mAb (left) and COVID-19 patient serum (right). Lane M : Protein marker, Lane N: purified N protein.

Performance of the developed COVID-19 IgM/IgG Rapid test

The results in Table 2 showed the sensitivity of the kit for antibody to N protein detection in serum of COVID-19 patients at 35.09%, 47.62% and 87.51% for 1-7, 8-14 and ≥15 days after onset, respectively. The specificity of the test was of 99.5% (199/200). In addition, the developed

test showed no cross-reactivity with samples of various infection diseases including measles, mumps, mycoplasma, HIV, HCV, EV71, CA10, CA16, influenza virus, and autoimmune diseases.

Table 2 Performance of the COVID-19 IgM/IgG rapid test for detection of antibodies in response to SARS-CoV-2 infection at different time since onset of the disease

Days after onset	Samples (n)	Overall Sensitivity, n (%)	Detectable antibody in serum, n (%)		
			IgG	IgM	IgM/IgG
1 - 7	57	20 (35.09)	8 (14.04)	6 (10.35)	6 (10.53)
8 - 14	42	20 (47.62)	9 (21.43)	1 (2.38)	10 (23.81)
≥ 15	33	28 (87.51)	13 (39.39)	0 (0.00)	15 (45.45)

Stability of COVID-19 IgM/IgG Rapid test

The accelerated aging test result was shown in Table 3. It was found that the test strips' performance could be affected by thermal stress. The test strips stored at 55 °C for 3-21 days did not show any significant change in performance, however, the test line's intensity started to drop after day 23, resulting in false negative results for some positive serum samples. According to ASTM F1980, aging at 55 °C for 21 days was equivalent to 4 °C for 2 years. Hence, it is recommended to store the test strips at 4 °C.

Table 3 The accelerated aging test at 55 °C of the test strips

Days	Positive IgG and IgM		Positive IgG		Positive IgM		Negative		Result
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
0	+3	+2	+3	-ve	-ve	+1	-ve	-ve	Pass
3	+3	+2	+3	-ve	-ve	+1	-ve	-ve	Pass
5	+3	+2	+3	-ve	-ve	+1	-ve	-ve	Pass
11	+3	+2	+3	-ve	-ve	+1	-ve	-ve	Pass
21	+3	+2	+3	-ve	-ve	+1	-ve	-ve	Pass
23	+3	+1	+3	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	Fail
32	+2	-ve	+1	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	Fail

Note: “-ve” indicated negative

Discussion

The immunochromatographic rapid test for detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies which are captured by N protein expressed in mammalian cells is developed. Assay sensitivity related to onset illness days according to antibody response showed sensitivity of 35.09%, 47.62% and 87.51% at 4-7, 8-14 as and ≥ 15 days after onset, respectively with high specificity at 99.5%.

The SARS-CoV-2's N-protein, an immunogenic and the most abundant viral protein, has 90% amino acid homology to previous endemic SARS-CoV's N-protein. However, there are no evidences of SARS-CoV re-emerging since 2003 or 17 years ago⁽¹⁵⁾. As follows, N-protein is applicable for being used as antigen in development of antibody detection tool. Furthermore, the level of antibody against N-protein remarkably correlates to viral neutralising antibody titer in COVID-19 patients in ELISA and PRNT₅₀ along with microneutralisation assay as well as anti-S protein antibodies when it is evaluated using RBD based ELISA^(7,15).

In addition, the rapid test showed no cross-reactivity with blood sera of various infectious diseases and inflammatory autoimmune diseases. Despite the fact that this rapid test should be examined with SARS-CoV, MERS-CoV as well as other common human coronaviruses including HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63 and HCoV-229E to determine if it has any cross-reactivity in validation, it was not possible to perform due to lack of those specimens. It was reported that no-cross reactivity of antibody from patients with other HCoVs infection to N protein of SARS-CoV was demonstrated⁽¹⁵⁾. Likewise, the cell lines expressed-N protein is also applied as a capture molecule in the in-house indirect ELISA development since it may express the protein in the right structure. Whilst, in some commercial N-proteins, different expression systems might affect the protein configuration which possibly result in reducing or stop of antibody recognition⁽¹⁶⁾.

In stability study, the rapid test is considered their stability through accelerated condition at 55 °C to study the shelf-life due to time constraints. Consequently, the result indicated that the test remains valid for 2 years at 4 °C storage⁽²³⁾. For further study, three lots of manufacturing will be examined in real time and accelerated conditions and tested with the panel sera including negative, low, medium and strong titers of positive to ensure life span of the rapid test kit.

In this study, the sensitivity of antibody detection increased in the later phase of infection that may reflect seroconversion in patients. Additionally, it was reported that in severe symptomatic patients, the level of antibody in their blood is higher, compared to those mild or asymptomatic patients⁽¹⁵⁾ whose convalescent plasma were also shown lower antibody level. Thus, the development of rapid test needs a large number of samples, patient's onset day, severity of symptom and other essential factors to evaluate assay sensitivity and specificity in method validation. Moreover, a prevalence of COVID-19 in Thailand is low, resulting in the requirement of high specificity of rapid tests for screening and monitoring the disease.

This lateral flow rapid test for anti-SARS-CoV-2 detection is enable to detect target analyte in serum, plasma which is portable to test in site of quarantine or remote area. Moreover, the test kit is also cost effective, non-labour intensive and non-scientific instrument requirement that is suitable for serosurveillance study.

Conclusion

The immunochromatographic rapid test for detection of anti-SARS-CoV-2 antibody (Covid-19 IgM/IgG Rapid Test) using N protein as antigen was successfully developed. The test kit

has sensitivity of 35.09%, 47.62% and 87.51% at 1-7, 8-14 and ≥ 15 days after onset, respectively with 99.5% specificity. The results showed non-cross reactivity with other antibodies from various diseases in tested samples. The rapid test should be stored at 4 °C that can be prolong shelf life for 2 years.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Busarawan Sriwanthana, Head of Senior Technical Office, Miss Malinee Chittaganpith, Advisory expert and Miss Nanthwan Mekha, Expert Medical Scientist for thoughtful support and encouragement. Finally, we thank to Director of Regional Medical Sciences Centers and staffs for collaborative effort in this research.

References

1. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its virus – a statement of the Coronavirus Study Group. bioRxiv. [serial online] 2020; [cited 2020 Jun 6]; xx(xx) [20 screens]. Available from: URL: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2020/02/11/2020.02.07.937862.full.pdf>.
2. Chan JFW, Yuan S, Kok KH, To KKW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. Lancet 2020; 395: 514-23.
3. Illinois Department of Public Health (IDPH). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): frequently asked questions. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 6]; [10 screens]. Available from: URL: <http://www.dph.illinois.gov/topics-services/diseases-and-conditions/diseases-a-z-list/coronavirus/faq>.
4. Yang CL, Qiu X, Zeng YK, Jiang M, Fan HR, Zhang ZM. Coronavirus disease 2019: a clinical review. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2020; 24(8): 4585-96.
5. World Health Organization. Timeline of WHO's response to COVID-19. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 30]; [32 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/detail/29-06-2020-covidtimeline>.
6. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) situation reports-157. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 26]; [17 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200625-covid-19-sitrep-157.pdf?sfvrsn=423f4a82_2.
7. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. Lancet Infect Dis 2020; 20(5): 565-74.
8. Cheng VCC, Lau SKP, Woo PCY, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. Clin Microbiol Rev 2007; 20(4): 660-94.

9. Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yuen KY. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28(2): 465–522.
10. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* [serial online]. 2020; [cited 2020 Jun 30]; XX(X): [22 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>.
11. Guan W, Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; 382(18): 1708–20.
12. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579: 270–3.
13. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV -- a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(3): 226–36.
14. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* [serial online]. 2020; [cited 2020 Jun 30]; 10(7): [11 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.009>.
15. Okba NMA, Muller MA, Li W, Wang C, Geurtsvan-Kessel CH, Corman VM, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *medRxiv.* [serial online]. 2020; [cited 2020 Jun 30]; XX(X): [18 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038059>.
16. Petherick A. Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *Lancet* 2020; 395: 1101–2.
17. Huang X, Liu X, Chen J, Bao Y, Hou J, Lu X, et al. Evaluation of blood-based antibody rapid testing for HIV early therapy: a meta-analysis of the evidence. *Front Immunol* 2018; 9: 1458. (9 pages).
18. Wu FY, Liao YW, Wu JF, Chen HL, Hsu HY, Chang MH, et al. A simple and rapid test-card method to detect hepatitis B surface antigen and antibody: potential application in young children and infants. *Pediatr Neonatol* 2016; 57(3): 219–24.
19. Kim YH, Lee J, Kim YE, Chong CK, Pinchemel Y, Reisdörfer F, et al. Development of a rapid diagnostic test kit to detect IgG/IgM antibody against Zika virus using monoclonal antibodies to the envelope and non-structural protein 1 of the virus. *Korean J Parasitol* 2018; 56(1): 61–70.
20. Dhepakson P, Prachasuphap A, Jullaksorn D, Luengchaichaweng A, Soonthornchattrawat S, Chaiya P. Transfection optimization for expression of the recombinant monoclonal antibody against *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in mammalian cells. *Bull Dept Med Sci* 2016; 58(4): 257–69.
21. Chong CK, Jeong W, Kim HY, An DJ, Jeoung HY, Ryu JE, et al. Development and clinical evaluation of a rapid serodiagnostic test for toxoplasmosis of cats using recombinant SAG1 antigen. *Korean J Parasitol* 2011; 49(3): 207–12.



22. Lee GC, Jeon ES, Le DT, Kim TS, Yoo JH, Kim HY, et al. Development and evaluation of a rapid diagnostic test for *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* and mixed-species malaria antigens. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85(6): 989-93.
 23. ASTM F1980-16, Standard guide for accelerated aging of sterile barrier systems for medical devices. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2016.
-

การพัฒนาและประเมินคุณภาพชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดี IgM/IgG ต่อ SARS-CoV-2 ชนิดรวดเร็วโดยอิมมูโนโครมาโตกราฟี

ปนัดดา เทพอัศร อณิชา เลื่องชัยเชวง อภิชัย ประชาสุภาพ สกฤรัตน์ สุนทรฉัตรวัฒน์ กษัตริ์ จงปิติทรัพย์ พรทิพย์ ไชยยะ กวีวรรณ มงคลศิริ พันธิดา ตรียวง นลินี แสงทอง ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ ลภัสรดา มุ่งมงคล กฤตมน โสภณดิลก และอาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่เกิดจากไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ SARS-CoV-2 เป็นสาเหตุเกิดโรค COVID-19 ซึ่งเป็นหนึ่งในโรคระบาดที่มีความรุนแรง และแพร่กระจายในวงกว้างสำหรับมนุษย์ การตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อโดยวิธี RT-PCR สามารถบ่งชี้ผู้ที่อยู่ระหว่างการติดเชื้อ และใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคและการค้นหาผู้ป่วย การทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาสามารถบอกถึงการได้รับเชื้อมาแล้ว และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายวัตถุประสงค์ การศึกษานี้ได้พัฒนาชุดตรวจ COVID-19 IgM/IgG ชนิดรวดเร็ว เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีในผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ชุดตรวจดังกล่าวใช้ N-protein ของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่สร้างในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นแอนติเจน โดยเชื่อมกับอนุภาคทอง และนำมาประเมินผลกับตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 132 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่ามีความไวร้อยละ 35.09, 47.62 และ 87.51 ในตัวอย่างผู้ป่วยหลังมีอาการที่ 1-7, 8-14 และ ≥ 15 วัน ตามลำดับ และไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีต่อโรคอื่นๆ ในตัวอย่างที่ทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าชุดตรวจนี้มีความจำเพาะสูงที่ร้อยละ 99.5

คำสำคัญ: SARS-CoV-2, การทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา, N-Protein, การตรวจหาแอนติบอดี, ชุดตรวจ COVID-19 IgM/IgG ชนิดรวดเร็ว

Development of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of COVID-19

Lapasrada Mungmongkol¹ Porntip Chaiya¹ Parnuphan Panyajai¹
Sakulrat Soonthorncharttrawat¹ Sumalee Chanama² Archawin Rojanawiwat¹
and Panadda Dhepakson²

¹Medical Life Science Institute, ²National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Emerging of pandemic coronavirus disease-19 (COVID-19) is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) leading to diverse respiratory pathological disorders particularly severe pneumonia worldwide. Serological tests are essential approach to support diagnosis. We developed immunological assays based on capture ELISA to detect immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein presented in sera of COVID-19 patients. Four main conditions were optimised including concentration of capture molecule, sample dilution ratio, blocking reagent and concentration of conjugated protein. Anti-SARS-CoV-2 IgM ELISA showed 41.46% sensitivity and 99% specificity while sensitivity and specificity of anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA were 60.98% and 100%, respectively. In addition, the cut-off thresholds were established at 3.2 for IgM ELISA and 2.2 for IgG ELISA, sensitivity of IgM and IgG assays was increased to 51.28% and 89.74% based on duration of onset, respectively. It is suggested that our developed ELISA could be used to determine antibody to SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19, ELISA, SARS-CoV-2, IgM, IgG

Corresponding author E-mail: Lapasrada.m@dmisc.mail.go.th

Received: 18 July 2020

Revised: 24 August 2020

Accepted: 18 September 2020

Introduction

The global pandemic coronavirus disease 2019 is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) which belongs to Betacoronavirus in Coronaviridae family⁽¹⁾. COVID-19 considerably widespread via airborne transmission in human to human with zoonotic origin and have been found R_0 between 2.2–2.6. Fever, fatigue, pneumonia and respiratory symptoms are a typical manifestation in COVID-19⁽²⁾. On the contrary, certain number of confirmed cases reveal asymptomatic or other associated pathological findings such as multiple patchy, Guillain-Barré and hyposmia. Previous research indicated that the average of incubation period is about 5–6 days as related to 14 days for quarantine recommendation of public measures⁽³⁾.

Thai Ministry of Public Health has worked co-ordinately with World Health Organisation to prevent the outbreak that contributes the outcomes as follow; approximately 3000 confirmed cases with 1.8% fatal cases but 2945 recovered cases have been reported or around 95%⁽⁴⁾. Aftermath, the emergence of viral infection affects not only health and well-being in population but in socio-economic scheme as well.

Mucosal droplets containing viral germs have been reported as mode of transmission which affected respiratory airway and may be caused multi-organ failure. Meanwhile, viral particle is composed of diverse fundamental proteins in replication, formation and host attachment. Depending on cellular proteases, there are two major receptors including dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) for entry mechanisms by binding to viral receptor-binding domain (RBD)⁽⁵⁾. After infection, host innate immunity recognises pathogen associated molecular patterns (PAMs) through endosomal receptors, leading to downstream signalling and antiviral cytokine expression in first line of defence⁽⁶⁾. Thereafter, both cell-mediated and humoral immunity are triggered in adaptive immune response. T-lymphocyte obtains the antigens through major histocompatibility complex and subsequently transfers antigens to B-cell, leading to cell proliferation and differentiation. Indeed, T-lymphocyte is divided into subpopulation including cytotoxic T-cells (CD3+CD8+), regulatory T-cells (FOXP3) and helper T-cells (CD3+CD4+) with different functions⁽⁷⁾. Likewise, excessive pro-inflammatory cytokines and chemokines such as Interferon family, IL-6 and CCL2 in cell-cell interaction cause cytokine storm in some severe cases⁽⁸⁾. Being stimulated by helper T-cells, B-lymphocytes differentiate into plasma cells to generate diverse serotypes of immunoglobulin. Similarly, SARS-CoV-2 antigens are also presented to B-cells via MHC class II molecules and thereafter plasma cells produce antibodies against various epitopes of SARS-CoV-2 into circulation for neutralisation as well as enhancement of phagocytosis^(9,10).

Early detection of COVID-19 leads to effective treatment and emerging control. There are different diagnostic tools with different principles to be used in diagnosis, for instance, patient history, vital signs, thoracic imaging and laboratory results. Likewise, reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), particularly real-time RT-PCR, is an assay to ensure viral infection by detection of SARS-CoV-2 viral RNA, spike protein and nucleocapsid encoded genes with high sensitivity and high specificity. Even though molecular techniques provide reliable

results, high throughput and less time consumption in early detection, but limitation was found. Moreover, molecular assays required labour intensive for good specimen collecting and performing excellent analytical process⁽¹¹⁾.

Immunological assays are available for monitoring the progressive of disease and evaluation of host immune status. Increasing of immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) could be distinguished early stage or chronic phase of infection. Antibodies and viral proteins as target biomarkers have been detected in blood samples and body fluids by various serological methods for example lateral flow immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), luminescent immunoassay, neutralisation assay as well as biosensor test. The ELISA method has been designed to quantify antibodies, antigen or hormone in sera binding specifically to target analyte and then antigen-antibody complexes are detected throughout their colorimetric or fluorescent signals.

COVID-19 IgM/IgG ELISA could provide some beneficial aspects. It detects specific antibodies which show higher stability in sera than viral RNA. Unlike molecular techniques, patient sera could be collected through standard phlebotomy which could reduce contamination of interferences in samples. Additionally, presence of specific antibodies could be tracked previous infection in some cases. ELISA tests for COVID-19 IgM/IgG are recommended to interpret in parallel with molecular test results by healthcare professional for reliable result⁽¹²⁾. Therefore, this study aimed to develop and optimise the ELISA to detect levels of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG. Additionally, cross-reactivity and method precision were also evaluated possibilities of being the diagnostic tool for COVID-19 infection.

Materials and Methods

Source of specimens

A total of 123 blood samples of COVID-19 patients that confirmed positive with real-time RT-PCR and 200 negative serums that were collected from healthy volunteers under restrict criteria, 100 negative samples were collected before pandemic period and another 100 specimens collected during the outbreak. Similarly, 40 specimens of diverse infectious diseases including Mycoplasma infection, mumps, measles, HFMD, autoimmune disorders, hepatitis as well as HIV were used to analyse cross-reactivity of the COVID-19 ELISA test kit. All specimens were transferred under cold chain system and sera were separated by centrifugation at 1500xg for 10 minutes, inactivated at 56 °C for 30 minutes and then stored at -20 °C until use.

This study was approved by Ethical Committee of Department of Medical Sciences (0644/EC 190) on June 22, 2020.

Recombinant antigens

Recombinant nucleocapsid protein (NP), expressed in HEK293F mammalian cell line, was provided by Research and Development team of Medical Biotechnology Centre, Department of Medical Sciences.

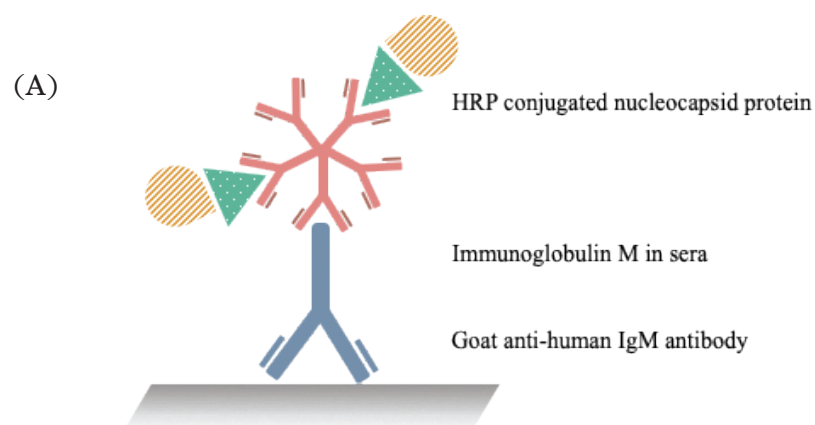
Statistical analysis

GraphPad prism version 6.0 was used for statistical analysis. The variables are concluded as the median along with Mann-Whitney test. Statistical significance was considered at P value <0.01.

Capture ELISA

Optimisation of COVID-19 IgM ELISA

To immobilise the primary antibody, goat anti-human IgM antibody (MP Biomedicals, Illkirch, France) was diluted in binding solution (0.6mM carbonate bicarbonate buffer pH9.4) into final concentrations of 5 and 10 µg/ml and 100 µl of each was added to each ELISA well (Nunc, Roskilde, Denmark). The coated plate was incubated for 16–18 hours at 4 °C and further washed for three times with 400 µl of 1x phosphate buffered saline pH7.4 (PBS)+0.1% Tween. Blocking was performed using 0.5% casein and 3% skim milk (sample diluent). After blocking procedure, 50 µl of each sera (1:100 and 1:200 dilution in sample diluent) was added and then incubated at room temperature for an hour before washing with wash buffer. HRP conjugated NP was prepared to final concentrations of 0.5, 0.75 as well as 1 µg/ml and 100 µl of the conjugated NP was added. The plate was incubated in a dark chamber at room temperature for an hour. After washing, 85 µl of TMB substrate (KPL, Gaithersburg USA) was added, further incubated in dark at room temperature for 30 minutes. The colour reaction was stopped by adding 50 µl of 1 N sulfuric acid. Colour development was read at 450/630 nm by an ELISA plate reader (Sunrise TM Absorbance Reader, TECAN, Switzerland). (Figure 1)



Factor	Assigned condition	Variable condition
Concentration of capture antibody	- Sample dilution 1:100	- 5 µg/ml
	- Blocking solution: 3% skim milk	- 10 µg/ml
	- Sample diluent: 3% skim milk	
	- Conjugated NP dilution: 0.75 µg/ml	
Sample dilution ratio	- Coating antibody: 10 µg/ml	
	- Blocking solution: 3% skim milk	- 1:100
	- Sample diluent: 3% skim milk	- 1:200
	- Conjugated NP dilution: 0.75 µg/ml	
	- Coating antibody: 10 µg/ml	
Blocking solution	- Sample dilution 1:100	- 0.5% casein
	- Sample diluent: 3% skim milk	- 3% skim milk
	- Conjugated NP dilution: 0.75 µg/ml	
Sample diluent	- Coating antibody: 10 µg/ml	- 0.5% casein
	- Sample dilution 1:100	- 3% skim milk
	- Blocking solution: 3% skim milk	
	- Conjugated NP dilution: 0.75 µg/ml	
Dilution of conjugated NP	- Coating antibody: 10 µg/ml	- 0.5 µg/ml
	- Sample dilution 1:100	- 0.75 µg/ml
	- Blocking solution: 3% skim milk	- 1 µg/ml
	- Sample diluent: 3% skim milk	

Figure 1 (A) Scheme of a COVID-19 IgM ELISA that the solid phase is coated by anti-human IgM antibody to capture target analyte in blood sample. Then, conjugated NP acts as detection molecule in specific binding with IgM. (B) COVID-19 IgM ELISA was optimised in various conditions.

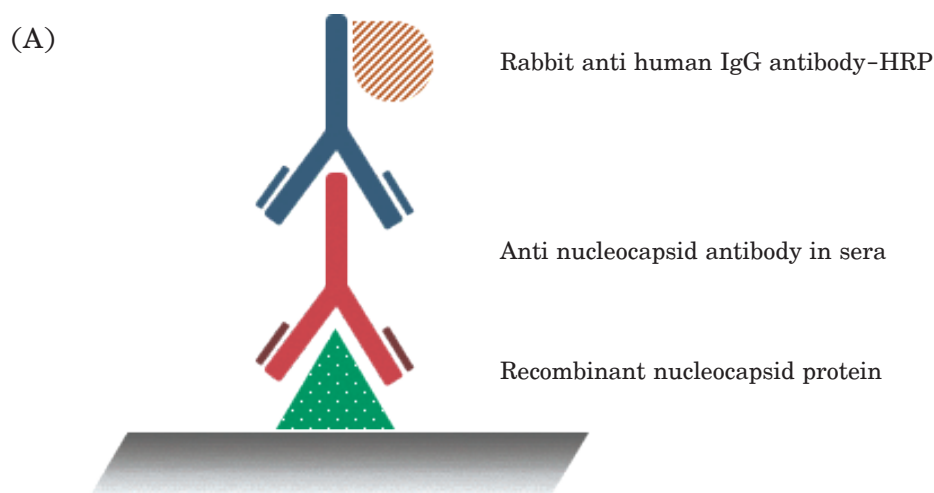
Evaluation of COVID-19 IgM ELISA

To evaluate COVID-19 IgM ELISA, 100 µl of 10 µg/ml Goat-anti human IgM antibody in binding solution was added into each ELISA well and incubated at 4 °C for 16-18 hours before flushing off and washing with 400 µl washing buffer (1X PBS+0.1% Tween-20) for three times. The plate was then blocked with 3% skim milk for at least 1 hour at room temperature. Patients' sera and control samples were diluted at 1:100 in 3% skim milk. After washing, 50 µl of diluted samples was applied into each ELISA well and incubated under room temperature for an hour before washing with wash buffer. Afterwards, HRP conjugated NP (0.75 µg/ml) was prepared and 100 µl of conjugated NP was added into ELISA well and further incubated away from light for an hour at room temperature. After 1 hour, the ELISA plate was washed and 85 µl of TMB substrate

was added, then incubated for 30 minutes in the dark chamber to develop colour of reaction. Subsequently, 50 µl of 1 N sulfuric acid was added into each well to stop the reaction and the absorbance was read at 450/630 nm.

Optimisation of COVID-19 IgG ELISA

Regarding to the conventional procedure, NP antigen was diluted in binding solution to final concentrations of 1 µg/ml, 5 µg/ml and 10 µg/ml and then 100 µl of capture molecule in coating buffer (0.6 mM carbonate bicarbonate buffer pH 9.4) was coated in 96 flat-bottom ELISA plate. Then, coated ELISA plate was incubated at 4 °C for overnight before flushing off and washing with 400 µl washing buffer (1X PBS+0.1% Tween-20) for three times. Blocking was performed with 0.5% casein, 2% BSA, 3% skim milk and 5% skim milk (sample diluent) for 1 hour at room temperature. After blocking procedure, 50 µl of each sera (1:100 and 1:200 dilution in sample diluent) was added and then incubated at room temperature for an hour before washing with wash buffer. HRP conjugated-anti human IgG antibody (Dako, Denmark) was prepared in blocking solution at various dilution including 1:5000, 1:8000, 1:12000 and 1:16000 and 100 µl of the conjugated protein was added. The plate was incubated in the dark chamber at room temperature for an hour. After washing, 85 µl of TMB substrate (KPL, Gaithersburg USA) was added, further incubated in dark at room temperature for 30 minutes. The colour reaction was stopped by adding 50 µl of 1 N sulfuric acid. Colour development was read at 450/630 nm by an ELISA plate reader (Sunrise TM Absorbance Reader, TECAN, Switzerland). (Figure 2)



(B)

Factor	Assigned condition	Variable condition
Concentration of capture NP	- Sample dilution 1:200	- 1 µg/ml
	- Blocking solution: 5% skim milk	- 5 µg/ml
	- Sample diluent: 5% skim milk	- 10 µg/ml
	- Conjugated antibody dilution: 1:16000	
Sample dilution ratio	- Capture NP: 1 µg/ml	- 1:100
	- Blocking solution: 5% skim milk	- 1:200
	- Sample diluent: 5% skim milk	
	- Conjugated antibody dilution: 1:16000	
Blocking solution	- Capture NP :1 µg/ml	- 0.5% casein
	- Sample dilution 1:200	- 2% BSA
	- Sample diluent: 5% skim milk	- 3% skim milk
	- Conjugated antibody dilution: 1:16000	- 5% skim milk
Sample diluent	- Capture NP: 1 µg/ml	- 0.5% casein
	- Sample dilution 1:200	- 2% BSA
	- Blocking solution: 5% skim milk	- 3% skim milk
	- Conjugated antibody dilution: 1:16000	- 5% skim milk
Dilution of conjugated antibody	- Capture NP :1 µg/ml	- 1:5000
	- Sample dilution 1:200	- 1:8000
	- Blocking solution: 5% skim milk	- 1:12000
	- Sample diluent: 5% skim milk	- 1:16000

Figure 2 (A) Scheme of a COVID-19 IgG ELISA that the solid phase is coated by recombinant NP to capture target analyte in blood sample. Then, HRP conjugated anti-human IgG antibody act as detection molecule in specific binding with IgG. (B) COVID-19 IgG ELISA was optimised in various conditions.

Evaluation of COVID-19 IgG ELISA

To evaluate COVID-19 IgG ELISA, 100 µl of 1 µg/ml recombinant NP in binding solution was added in each ELISA well and incubated at 4°C for 16–18 hours before flushing off and washing with 400 µl washing buffer (1X PBS+0.1% Tween-20) for three times. The plate was blocked by 5% skim milk for at least 1 hour at room temperature when patients' sera and control sample were diluted at 1:200 in 5% skim milk. After washing, 50 µl of diluted samples was applied into each ELISA well and incubated under room temperature for an hour before washing with wash buffer. Afterwards, polyclonal rabbit anti-human IgG antibody-HRP was diluted at 1:200 in sample diluent and 100 µl of conjugated antibody was added and further incubated away from

light for an hour at room temperature. After 1 hour, the ELISA plate was washed and 85 μ l of TMB substrate was added, then incubated for 30 minutes in the dark chamber to develop colour of reaction. Subsequently, 50 μ l of 1 N sulfuric acid was added into each well to stop the reaction and the absorbance was read at 450/630 nm.

Results

COVID-19 IgM ELISA

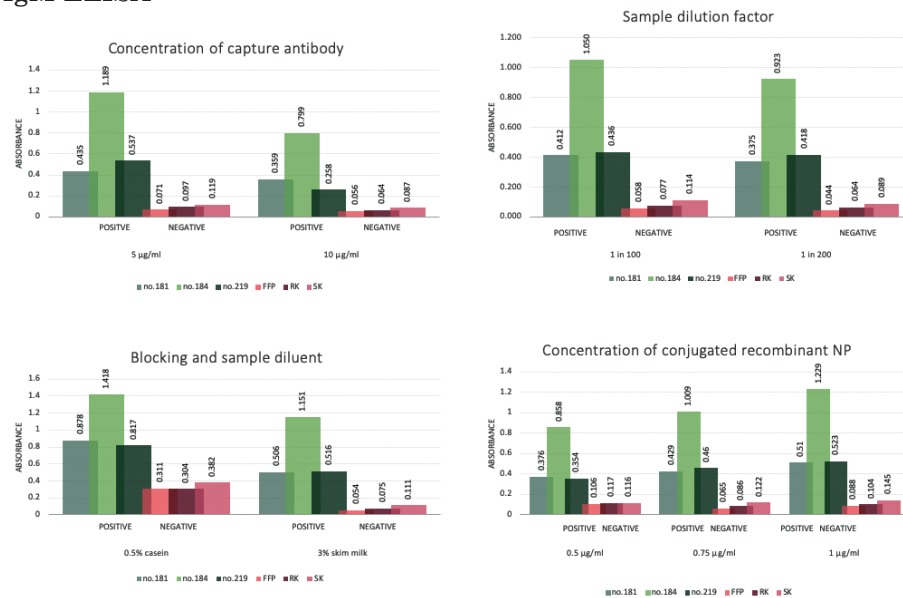
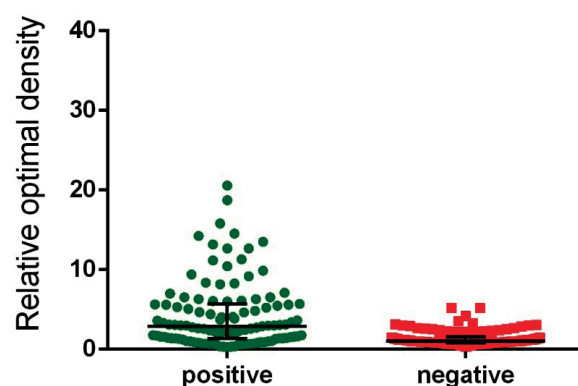


Figure 3 Optimisation of COVID-19 IgM ELISA conditions

Considering optimal conditions of COVID-19 IgM ELISA was based on (1) minimisation the absorbance value of negative sample (2) maximisation of absorbance in positive group to clearly distinguish positive sample from negative group and (3) lower concentration of protein was selected in case of indifferent outcome⁽¹³⁾. Therefore, the optimisation of COVID-19 IgM ELISA was found to be 5 μ g/ml of goat anti-human IgM polyclonal antibody, 3% skim milk, 1:100 sample dilution and 0.75 μ g/ml of HRP conjugated recombinant NP. (Figure 3)



Study group	Mean $\pm$ SD	Median (IQR)	P value
RT-PCR positive cases (n=123)	4.283 $\pm$ 4.209	2.910 (1.379–5.725)	<0.01
Healthy volunteers (n=200)	1.251 $\pm$ 0.650	1.025 (0.800–1.568)	<0.01

Figure 4 Relative optimal density plot between positive and healthy population as well as statistical analysis from data set of COVID-19 IgM ELISA.

The figure 4 demonstrated the comparison of relative optical density between two groups which were positive and healthy that one plot represents one ELISA unit. Each individual OD_{sample} is normalised by baseline unit which is derived from OD value of pooled negative plasma. Then, the outcomes show as the relative OD or ELISA unit to consider the method cut-off. Extended scatter in positive group have been shown when compared with healthy population. Likewise, statistic mean in both groups provides clearly distinguish including 4.297 in positive and 1.251 in negative groups whereas the median (IQR) examines more reliable parameter when P value less than 0.0001

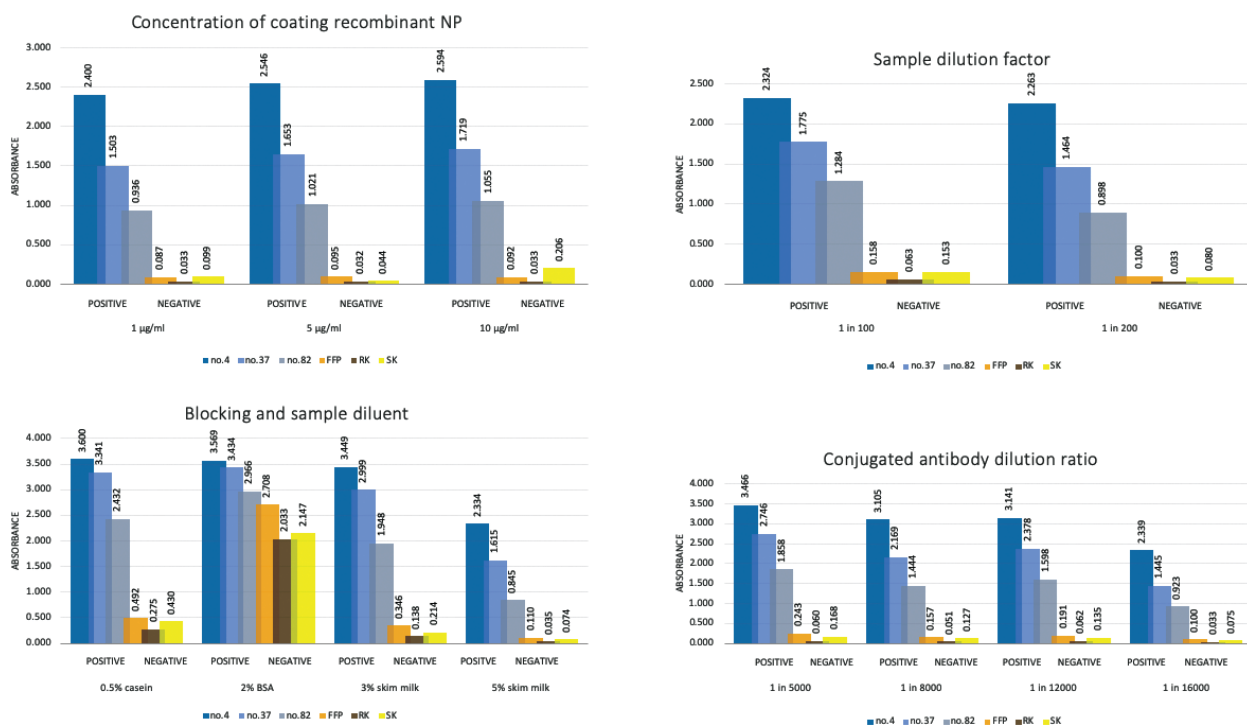
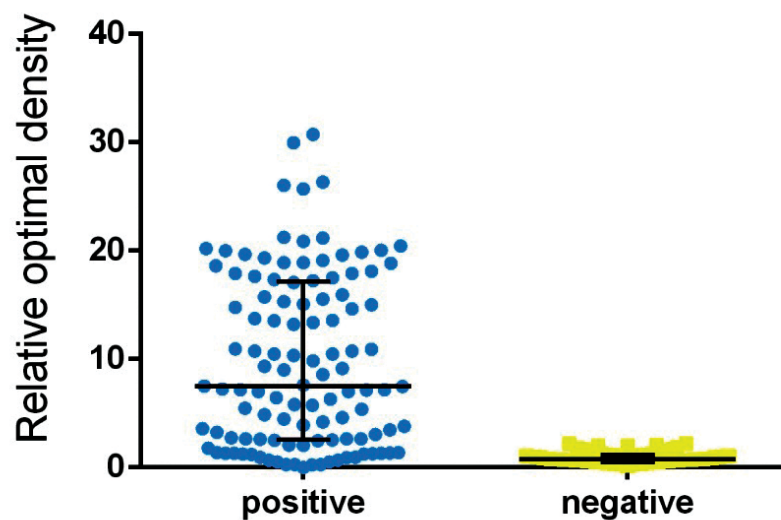


Figure 5 Optimisation of COVID-19 IgG ELISA conditions

Considering the condition of COVID-19 IgG ELISA was comparable to COVID-19 IgM ELISA based on minimisation of OD_{negative} along with maximisation of OD_{positive} to categorise two distinct group. Additionally, the concentration of protein was another influential factor to be concerned. With regards to our results (Figure5), optimal conditions of COVID-19 IgG ELISA were 1 µg/ml recombinant NP, 5% skim milk, 1:200 sample dilution and 1:16000 of HRP conjugated rabbit anti-human IgG.



Study group	Mean $\pm$ SD	Median (IQR)	<i>P</i> value
RT-PCR positive cases (n=123)	9.757 $\pm$ 7.889	7.507 (2.583-17.20)	<0.01
Healthy volunteers (n=200)	0.858 $\pm$ 0.431	0.740 (0.527-1.161)	<0.01

Figure 6 Relative optimal density plot between positive and healthy population as well as statistical analysis from data set of COVID-19 IgG ELISA.

The sets of raw data were normalised into relative OD or ELISA unit before statistical analysis and graph plotting. Both mean values were examined and found clearly distinguished between positive group (9.757) and healthy individuals (0.858). Moreover, median value in positive population was approximately higher than that in the negative group by 10 times. *P* value between two groups was less than 0.01. (Figure 6)

Determining the cut-off value in ELISA

According to Table 1, specificity of IgM ELISA at the threshold “mean+3 standard deviation of healthy” demonstrated the high value at 99.0 whereas their sensitivity was 41.46%. Besides, the sensitivity of the IgM ELISA was increased to 51.28% or approximately 10% when considered about the onset period at >14 days. Whilst the COVID-19 IgG ELISA showed 100% assay specificity at meanneg +3SD threshold despite the fact that assay sensitivity was 60.98%. However, the sensitivity rose roughly 30% to 89.74% in IgG ELISA by considering patients’ onset. Thereby, meanneg +3SD was a capable point to set the cut-off value when standards were not available. Thus, the cut-off for COVID-19 IgM set at 3.2 while COVID-19 IgG established the cut-off at 2.2.

Table 1 The cut-off value of ELISA

COVID-19 ELISA	Cut-off	Sensitivity (95% CI) N=123	Sensitivity (>14 day onset) N=39	Specificity (95% CI) N=200
COVID-19 IgM ELISA	3.2	41.46 (32.48–59.84)	51.28 (29.37–73.19)	99.00 (97.62–100.00)
COVID-19 IgM ELISA	2.2	60.98 (49.94–72.01)	89.74 (79.69–99.79)	100.00 (100.00–100.00)

Cross reactivity

Comparable three-dimensional structure in variant antigens possibly lead to cross reactivity particularly in binding of polyclonal immune response. From previous studies, T-cell receptor (TCR) cross-reactivity carries around 10^5 diverse peptides⁽¹⁴⁾. Therefore, serological diagnostic tool required cross-reactivity assessment. This study performed cross-reactivity with 40 positive cases of 7 infectious and inflammatory diseases including mycoplasma pneumoniae, mumps, measles, HFMD, autoimmune disorders, HCV as well as HIV. From the results, there are positive for mumps, autoimmune disorders in COVID-19 IgM ELISA. On the contrary, none of cross-reactivity was shown in COVID-19 IgG ELISA.

Table 2 Cross-reactivity results of both ELISA test systems.

Diseases	COVID-19 IgM ELISA	COVID-19 IgG ELISA
Mycoplasma pneumoniae (n=2)	–	–
Mumps (n=9)	1/9	–
Measles (n=9)	–	–
HFMD (n=5)	–	–
Autoimmune diseases (n=5)	2/5	–
Hepatitis C (n=5)	–	–
HIV (n=5)	–	–

Precision

To measure random error of the assay, ELISA tests for both IgM and IgG detection were completed within-run and between-run performance when within-run precision contributes the estimation of daily performance. Likewise, between-run provides the estimation between-day performance which carries more factors of operating error. Typically, less than 10 of %CV indicates excellent performance of the method and over 30% of coefficient of variation point out non-precise procedure^(15,16). Hence this in-house ELISA tests are acceptable to use for analysis since their %CV of selected samples are in the range from 0.3 to 23 (Table 3 & 4)

Table 3 Standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) in COVID-19 IgM ELISA in intra-lab study

precision	Strong positive				Adequate positive				Weak positive				Negative			
	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6		Sample 7		Sample 8	
	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Repeatability	0.21	0.6	0.10	0.3	1.07	6.7	0.33	2.5	0.26	2.7	0.20	2.3	0.03	3.9	0.01	1.0
Within day	6.11	16.9	5.86	15.7	2.21	13.9	1.91	14.1	2.19	18.0	0.70	7.2	0.05	9.7	0.05	8.3
Between day	3.35	8.5	3.17	7.7	1.06	6.2	1.29	8.9	1.86	16.1	1.48	16.8	0.09	12.9	0.05	8.0

Table 4 Standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) in COVID-19 IgG ELISA in intra-lab study

precision	Strong positive				Adequate positive				Weak positive				Negative			
	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6		Sample 7		Sample 8	
	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Repeatability	0.64	3.1	0.61	3.1	1.03	5.2	1.00	5.7	0.47	4.8	0.13	1.7	0.05	3.1	0.04	4.0
Within day	0.50	2.4	0.48	2.3	0.89	4.4	0.52	3.0	0.45	3.7	0.16	1.5	0.05	2.3	0.04	3.7
Between day	2.77	12.3	2.57	11.6	3.10	14.2	2.73	14.1	1.76	14.7	1.39	15.3	0.09	4.8	0.05	4.2

Discussion

To develop COVID-19 ELISA, four main factors were examined which were capture-molecule concentration, blocking solution, sample dilution and concentration of detection molecule. In COVID-19 IgM ELISA, 5 µg/ml anti-human IgM was coated in ELISA well and blocked with 3% skim milk when patients' sera were diluted by 1:100 ratio and then 0.75 µg/ml of HRP-conjugated recombinant NP was added to bind with antigen-antibody complex before measuring the colorimetric reaction. Whilst, immunoglobulin IgG against SARS-CoV2 in 1:200 diluted sample would be measured in 1 µg/ml recombinant NP coated plate that was blocked in 5% skim milk before binding to 1:16000 prepared anti-human IgG HRP. Both ELISA tests contributed colorimetric reaction and were measured at 450/630 to obtain absorbance values.

Without primary standard method to compare, raw data have to normalise by absorbance value of pooled negative sample (OD pooled negative) resulting in one ELISA unit or relative OD for further analysis. In this point, meanpositive -3SD and meannegative +3SD are considered to be use as formula for cut-off calculation⁽¹⁷⁾. Using meanneg +3SD in our study as the cut-off value could provide higher specificity, i.e., 99% specificity in COVID-19 IgM ELISA and 100% specificity in COVID-19 IgG test and decreased possibilities of false positive results. The assays developed were suitable to use in low prevalence countries such as Thailand⁽¹⁸⁾ which high specificity test is required to ensure infection.

As for cross-reactivity, there were positive for mumps, autoimmune disorders in COVID-19 IgM ELISA, while, none of cross-reactivity was shown in COVID-19 IgG ELISA. Thus, false positive results from other infectious diseases might occur for the COVID-19 IgM ELISA. Moreover, within-run and between-run performances revealed the value of %CV which were in the range from 0.3 to 23 indicating adequate precision of the method. From our results, both systems for antibody detection should be further developed to ensure high precision of analytical results with less than 10% of CV.

Conclusion

COVID-19 IgM ELISA was able to be used for detection of immunoglobulin M against SARS-CoV-2 with 41.46% sensitivity and 99% specificity. Additionally, COVID-19 IgG ELISA could use to detect immunoglobulin G against SARS-CoV-2 in blood sample with 60.98% sensitivity and 100% specificity. The possibility of cross-reactivity with mumps and auto-immune diseases were demonstrated with COVID-19 IgM ELISA.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Department of Medical Sciences. We sincerely appreciate Clinical Research Centre (CRC) as well as MBC's research team to support blood specimens, antibodies and recombinant NP. Without the effort and kind encouragement from supportive colleagues, this study would be difficulty to accomplish.

References

1. Mackenzie JS, Smith DW. COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't. *Microbiol Aust* 2020; 41(1): 45-50.
2. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med* 2020; 382(13): 1199-207.
3. Ahmad I, Rathore FA. Neurological manifestations and complications of COVID-19: a literature review. *J Clin Neurosci* 2020; 77: 8-12.
4. World Health Organization. Novel coronavirus (COVID-19). [online]. 2020; [cited 20 May 2020]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/thailand/emergencies/novel-coronavirus-2019>.
5. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: origin, transmission and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res* 2020; 24: 91-8.
6. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2020; 38(1): 1-9.

7. Tufan A, GÜler AA, Matucci-Cerinic M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. *Turk J Med Sci* 2020; 50(SI-1): 620-32.
8. Coperchini F, Chiovato L, Croce L, Magri F, Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: an overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 53: 25-32.
9. Molnar C, Gair J. Adaptive immune response. In: *Concepts of biology - 1st Canadian edition*. [online]. 2019; [cited 20 May 2020]; [25 screens]. Available from: URL: <https://opentextbc.ca/biology/chapter/23-2-adaptive-immune-response>.
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
11. Zhai P, Ding Y, Wu X, Long J, Zhong Y, Li Y. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55(5): 105955. (13 pages).
12. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Cent Sci* 2020; 6(5): 591-605.
13. Meyer B, Torriani G, Yerly S, Mazza L, Calame A, Arm-Vernez I, et al. Validation of a commercially available SARS-CoV-2 serological immunoassay. *Clin Microbiol Infect*. [serial online]. 2020; [cited 20 May 2020]; XX(X): [9 screens]. Available from: URL: <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showPdf?pii=S1198-743X%2820%2930368-2>.
14. Petrova G, Ferrante A, Gorski J. Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system. *Crit Rev Immunol* 2012; 32(4): 349-72.
15. Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(6): 1235-9.
16. Wattanaphansak S, Asawakarn T, Gebhart CJ, Deen J. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20(2): 170-7.
17. Classen DC, Morningstar JM, Shanley JD. Detection of antibody to murine cytomegalovirus by enzyme-linked immunosorbent and indirect immunofluorescence assays. *J Clin Microbiol* 1987; 25(4): 600-4.
18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). COVID-19 in Thailand: watch - level 1, COVID-19 risk in Thailand is low, new cases are decreasing or stable. [online]. 2020; [cited 2020 Sep 3]; [2 screens]. Available from: URL: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/notices/watch/coronavirus-thailand>

การพัฒนาชุดตรวจหลักการอีไลซ่าสำหรับตรวจทาง ห้องปฏิบัติการทางน้ำเหลืองวิทยาโรคโควิด-19

ลภัสรดา มุ่งมงคล¹ พรทิพย์ ไชยยะ¹ ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ¹ สกฤตน์ สุนทรจัตราวัฒน์¹

สุมาลี ชะนะมา² อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์¹ และปนัดดา เทพอัศศรี¹

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ²สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์
นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การแพร่ระบาดใหญ่ของโรคโควิด-19 จากเชื้อ SARS-CoV-2 ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในระบบทางเดินหายใจที่หลากหลายโดยเฉพาะก่อให้เกิดโรคปอดบวมรุนแรงทั่วโลก การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยหลักการอีไลซ่าเพื่อตรวจวัดแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 ในตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ ได้แก่ ความเข้มข้นของโมเลกุลที่ถูกตรึงไว้จับแอนติบอดีเป้าหมาย, อัตราส่วนการเจือจางตัวอย่าง, สารละลายบล็อกกิ้ง และความเข้มข้นของโมเลกุลที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ผลการวิเคราะห์พบว่าอีไลซ่าสำหรับไอจีเอ็มที่ค่าจุดตัดที่ 3.2 หน่วยอีไลซ่าซึ่งให้ค่าความไวที่ร้อยละ 41.46 และความจำเพาะร้อยละ 99 โดยในส่วนของอีไลซ่าเพื่อตรวจไอจีจีที่ค่าจุดตัด 2.2 หน่วยอีไลซ่าให้ค่าความไวที่ร้อยละ 60.98 และความจำเพาะร้อยละ 100 นอกจากนี้พบว่าค่าความไวของอีไลซ่าสำหรับไอจีเอ็มและไอจีจีเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 51.28 และ 89.74 ตามลำดับ ขึ้นกับระยะเวลาของการติดเชื้อ การศึกษานี้แสดงว่าชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ได้

คำสำคัญ: โควิด-19, อีไลซ่า, SARS-CoV-2, อิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม, อิมมูโนโกลบูลิน จี

การพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี Reverse Transcription Droplet Digital PCR

นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา ญัฐกุล บุญเนื่อง วิมาลา อินอุ่นโชติ วริษฐา แสงดี และสุริศเมธ มหาศิริมงคล
กองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การแพร่ระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 ทั่วโลกส่งผลกระทบต่อทั้งทางสาธารณสุข สังคม และเศรษฐกิจ ทำให้มีการเร่งพัฒนาทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์อย่างมากในด้านการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ การรักษา และวัคซีน เพื่อควบคุมการระบาดของไวรัสนี้ การตรวจวัดปริมาณเชื้อ SARS-CoV-2 มีความสำคัญในการศึกษาวิจัยด้านพยากรณ์โรคและการติดตามผลการรักษา รวมทั้งการเตรียมอาร์เอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งการใช้เทคนิค quantitative real-time PCR เพื่อตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมมีข้อจำกัดเรื่องความแม่นยำ และจำเป็นต้องทำ standard curve ควบคู่กับการตรวจตัวอย่างทุกครั้ง การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค reverse-transcription droplet digital PCR (RT-ddPCR) โดยการตรวจยีน *RNA dependent RNA polymerase (RdRp)* มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจที่ 800 copies/ml ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ โดยมีค่าการวัดเป็นเส้นตรงช่วง 1.8×10^3 ถึง 5.54×10^6 copies/ml วิธีนี้สามารถนำไปใช้ตรวจปริมาณเชื้อ SARS-CoV-2 ในตัวอย่างอาร์เอ็นเออ้างอิงและตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อ การพัฒนาวิธีการเก็บตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยให้มีคุณภาพและการรักษาสภาพอาร์เอ็นเอของไวรัสในตัวอย่างตรวจจะช่วยให้การตรวจวัดปริมาณไวรัสมีความถูกต้องมากขึ้น

คำสำคัญ: โคโรนา-19, SARS-CoV-2, การตรวจวัดปริมาณ, RT-ddPCR

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

Received: 30 June 2020

Revised: 25 August 2020

Accepted: 7 September 2020

บทนำ

โรคกลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus disease 2019: COVID-19) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสกลุ่มโคโรนาชื่อ Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) หรือชื่อที่องค์การอนามัยโลกเคยใช้คือ ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (2019-nCoV) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสเหมือน mRNA (positive-sense single-stranded RNA) พบผู้ป่วยรายแรกในเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน ในเดือนธันวาคม 2562 และเกิดการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในประเทศจีนและประเทศอื่นทุกภูมิภาคทั่วโลก^(1, 2, 3) ไวรัสสามารถแพร่จากคนสู่คนจากการไอหรือจามของผู้ติดเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจผ่านทางจมูก ปาก หรือตา ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มีอาการคล้ายหวัดหรือไม่มีอาการ ส่วนน้อยประมาณร้อยละ 20 มีอาการรุนแรง ปอดอักเสบ หายใจลำบาก จนถึงขั้นเสียชีวิต โดยมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรงในผู้ที่มิระบบภูมิคุ้มกันเสื่อมหรือบกพร่อง เช่น ผู้สูงอายุ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน หรือโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยจับกับ Angiotensin-converting enzyme 2 receptor (ACE2) ซึ่งพบได้ที่ผิวเซลล์เยื่อทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่าง รวมทั้งต่อมน้ำลาย หัวใจ ไต ทางเดินอาหาร หลังรับเชื้อ 2-14 วันจะเริ่มแสดงอาการ ไวรัสมักขับออกในสารคัดหลั่งระบบทางเดินหายใจ และทางเดินอาหาร^(4, 5)

การตรวจการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ใช้การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในตัวอย่างจากผู้ป่วย หรือผู้เข้าข่ายต้องสงสัย หรือมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อ วิธีตรวจที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลกคือ real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) ซึ่งเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมจำเพาะของไวรัส⁽⁶⁾ ยีนเป้าหมายการตรวจที่ใช้กันมากได้แก่ยีน *RNA dependent RNA polymerase (RdRp)*, *nucleocapsid (N)*, *envelop (E)* และ *spike (S)* โดยเป็นการตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) รายงานผลเป็นพบหรือไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัส ค่า cycle threshold (Ct) ของแต่ละตัวอย่างเป็นการบอกแนวโน้มของการพบเชื้อมากหรือน้อย แต่ไม่สามารถระบุปริมาณเป็นจำนวน copy เว้นแต่มีการตรวจแบบวิธี quantitative real-time PCR เปรียบเทียบค่า Ct ที่ได้กับตัวอย่างอาร์เอ็นเอ/ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบจำนวน copy (calibrator) โดยการทำให้ standard curve เนื่องจากค่า Ct จากการตรวจแต่ละครั้งมีความผันแปรได้สูง จึงต้องทำการตรวจแบบ 3 ซ้ำ (triplicate) ทั้งตัวอย่างตรวจและตัวอย่างมาตรฐาน และจำเป็นต้องทำ standard curve ทุกครั้งของการตรวจ ทำให้ไม่สะดวก สิ้นเปลืองทรัพยากรและค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ค่าปริมาณที่ได้ถือเป็นค่าเปรียบเทียบ (relative quantitative number) เพราะเป็นการทำปฏิกิริยาคนละหลอดภายใต้สภาวะมาตรฐานว่าตัวอย่างและ calibrator มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเท่ากัน

วิธีการตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค digital PCR (dPCR) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวของการตรวจวัดเชิงปริมาณด้วยวิธี real-time PCR^(7, 8, 9, 10, 11) โดยใช้หลักการแบ่งปฏิกิริยา PCR (partition) ออกเป็นจำนวนหลายพันปฏิกิริยาในปริมาตรขนาดเล็กระดับนาโนลิตร ซึ่งทำได้ 2 ระบบ คือ การใช้เพลทหลุมขนาดเล็ก (nanoplate-based dPCR) และ การใช้ water-in-oil emulsion แทนหลุมปฏิกิริยา (droplet-based dPCR; ddPCR) โดยมีขั้นตอนเจือจางดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนผสมกับน้ำยา PCR ที่มี primer และ probe จำเพาะก่อนแบ่ง partition หลังจากสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณรอบสุดท้ายในเครื่อง PCR แล้วจึงตรวจวัดสัญญาณแสงในแต่ละ partition ที่เป็นเป็นบวกหรือลบ (end point PCR) การเจือจางดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนการทำ PCR เพื่อทำให้เกิดการกระจายตัวในแต่ละ partition โดยอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมจะมีดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 copy ในบาง partition และไม่มีดีเอ็นเอในบาง partition การคำนวณอัตราส่วนระหว่าง partition บวกที่เกิด PCR product จากการมีดีเอ็นเอเป้าหมาย กับ partition ทั้งหมดตามสถิติปัวซอง (Poisson statistical analysis) ได้ค่าจำนวน copy ของแต่ละตัวอย่างอย่างถูกต้อง สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างกันของจำนวน copy ในแต่ละตัวอย่างได้อย่างแม่นยำกว่าวิธี real-time RT-PCR จึงมีการนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย^(9, 11, 12, 13) เช่น การตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน (gene expression) การวัดปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viral load) ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนในชิ้นเนื้อมะเร็ง (rare mutation of cancer) หรือตรวจวัดปริมาณท่อนดีเอ็นเอต้นแบบ (library preparation

quantification) สำหรับการตรวจลำดับสารพันธุกรรมชนิด next generation sequencing (NGS) การศึกษาได้พัฒนาเทคนิค RT-ddPCR เพื่อตรวจวัดปริมาณ SARS-CoV-2 โดยใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเออ้างอิง และทดสอบกับตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อ เพื่อการเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอมาตรฐาน และเตรียมห้องปฏิบัติการรองรับงานตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณไวรัสในตัวอย่างตรวจจากผู้ติดเชื้อเพื่อประเมินประสิทธิภาพการรักษา

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง SARS-CoV-2 RNA

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เท่ากับ 2×10^5 PFU/ml (ได้รับอนุเคราะห์จากฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ปริมาตร 300 μ l มาสกัดเป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 60 μ l (เท่ากับ 1×10^6 PFU/ml ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและเครื่องอัตโนมัติ (Chemagic™ Viral DNA/RNA 300 Kit H96 และ Chemagic™ 360 Perkin Elmer, Massachusetts, USA.) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนเอกสารกำกับของชุดน้ำยาและการใช้เครื่องมือ

ตัวอย่างผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2

ตัวอย่างอาร์เอ็นเอของผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่เป็นตัวอย่างเหลือจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการตรวจ COVID-19 ด้วยวิธี real-time RT-PCR จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างสกัดจากน้ำลายจำนวน 4 ตัวอย่าง และสกัดจาก nasopharyngeal swab และ/หรือ nasal swab (NPS/NS) จำนวน 17 ตัวอย่าง ซึ่งใช้ชุดน้ำยาและเครื่องมือการสกัดเช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเซลล์

การทำ RT-ddPCR

ใช้ primer และ probe สำหรับยีน *RdRp* ของ SARS-CoV-2 ตามวิธีการตรวจ RT-PCR ที่พัฒนาโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (อยู่ระหว่างตีพิมพ์เผยแพร่) มีลำดับเบส คือ *RdRp*-Fw primer; 5'-CTCACCTTATGGGTGGGATTATC-3' และ *RdRp*-Rv primer; 5'-AGTGAG-GCCATAATTCTAAGCATGT-3' เป็นชนิด high affinity purification (สังเคราะห์โดย Bio Basic Inc. Ontario, Canada) มีผลผลิตขนาด 73 bp และ *RdRp* probe; FAM-3'-TAAATGTGATAGAGCCATGCC-5'-BHQ1 ชนิด HPLC purification (สังเคราะห์โดย Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) ใช้ชุดน้ำยา One step RT ddPCR Advanced Kit for Probe (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) โดยในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 20 μ l ประกอบด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase และ DNA Polymerase ในบัฟเฟอร์ที่มีสารเคมีองค์ประกอบการทำ RT-PCR และ *RdRp* primers/probe หลังจากเติมตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 μ l นำไปทำ partition แบบ water-in-oil emulsion ด้วยเครื่อง droplet generator (QX200™ AutoDG Droplet Digital PCR System, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) ได้ droplet ขนาดประมาณ 1 นาโนลิตร ซึ่งในทุกการทดลองมีการทำ reagent control โดยใช้น้ำบริสุทธิ์แทนตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ทำการเพิ่มปริมาณในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (T-100™, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) ตั้งอุณหภูมิที่ 45 °C นาน 60 นาที เพื่อทำ cDNA และ ที่ 95 °C นาน 10 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ reverse transcriptase พร้อมกระตุ้น DNA polymerase แล้วจึงทำการเพิ่มปริมาณยีน *RdRp* จำนวน 40 รอบ ที่ 95 °C นาน 15 วินาที และ 50 °C นาน 1 นาที หลังจากนั้นจึงทำลายเอนไซม์ที่เหลือและทำให้ droplet มีความแข็งแรงที่ 98 °C นาน 10 นาที และ 4 °C อย่างน้อย 10 นาที อ่านสัญญาณแสง FAM channel ด้วยเครื่องอ่าน Droplet (QX200™ Droplet Reader, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลด้วย QuantaSoft™ Software v.1.7.4.0917 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) จากค่า droplet ที่ให้ผลบวก และ จำนวน droplet ทั้งหมดคำนวณเป็นค่า copies/ μ l ของ reaction และ ค่า 95% confidential interval (95% CI) เมื่อคูณด้วย 20 ซึ่งเป็นปริมาตรรวมในการทำ RT-ddPCR จะได้ค่าเป็น copies/reaction หรือเท่ากับจำนวน copy ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 μ l ใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2013 ในการ plot กราฟ และคำนวณค่าความสัมพันธ์ R^2 ระหว่างจำนวน copy และค่าการเจือจาง หรือค่า Ct

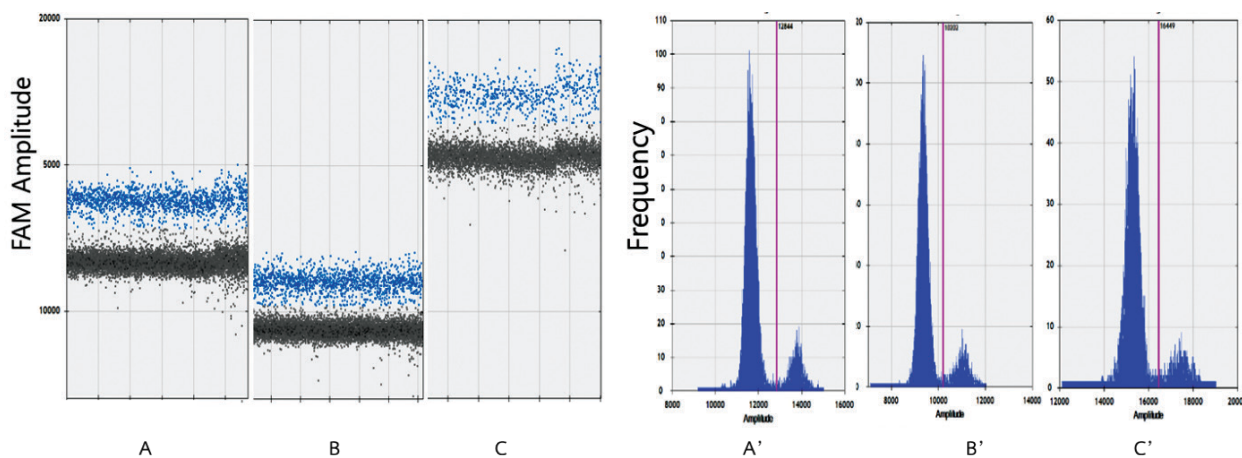
การทดสอบพารามิเตอร์ในการทำ RT-ddPCR

เพื่อหาสภาวะเหมาะสมในการทำ RT-ddPCR เพื่อตรวจวัดปริมาณ SARS-CoV-2 โดยการตรวจวัดยีน *RdRp* ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบ (1) ความเข้มข้นของ probe/primer ที่ 900/250 nM, 600/250 nM และ 600/300 nM (2) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน annealing/extension ระหว่างช่วงอุณหภูมิ 50–59 °C (3) ช่วงความสามารถในการตรวจ (detection range) โดยเจือจางตัวอย่าง SAR-S-CoV-2 RNA ที่มีค่า Ct เท่ากับ 20.31 จากการตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR ที่ 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/20,000, 1/40,000, 1/80,000, 1/100,000, และ 1/1,000,000 (4) อัตราส่วนการเจือจางตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมก่อนการทำ RT-ddPCR โดยทดสอบตัวอย่างอาร์เอ็นเอจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีค่า Ct เท่ากับ 18.24, 24.08, และ 28.32

ผล

การทดสอบความเข้มข้นของ primer/probe

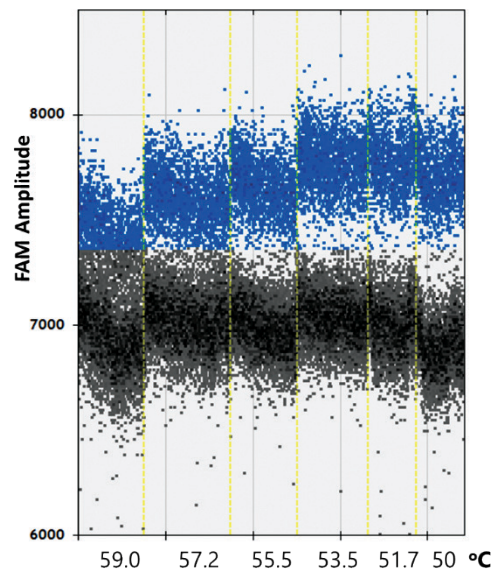
จากการใช้ primer/probe ที่ความเข้มข้น 900/250, 600/250, และ 600/300 nM ในการทำ RT-ddPCR ตรวจวัดค่าปริมาณไวรัสได้เท่ากับ 3,200 3,100 และ 2,860 copies/reaction ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าสัญญาณแสง (amplitude) ของ droplet ที่ให้ผลลบ (negative droplet) และ droplet ที่ให้ผลบวก (positive droplet) พบว่าความเข้มข้น primer/probe ที่ 900/250 nM ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นตามคำแนะนำในคู่มือที่น่ายา ให้ค่า FAM amplitude ของกลุ่ม negative droplet ไม่สูงจนเกินไป และมีระยะห่างจากกลุ่ม positive droplet กว้างกว่าที่ความเข้มข้นอื่น (ภาพที่ 1) จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 900/250 nM ในการใช้งานต่อไป



ภาพที่ 1 แสดง One-dimensional scatter plots (A, B, C) และ histograms (A', B', C') ของ droplet ที่ให้ผลบวก (แถบบนสีน้ำเงิน) และผลลบ (แถบล่างสีดำ) ด้วยวิธี RT-ddPCR เปรียบเทียบระหว่าง primer/probe ที่ความเข้มข้น 900/250 nM (A, A'), 600/250 nM (B, B'), และ 600/300 nM (C, C')

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *RdRp* ในขั้นตอน annealing/extension

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *RdRp* ในขั้นตอน annealing/extension ระหว่างช่วงอุณหภูมิที่ 50 – 59 °C พบว่าที่ 59 °C มี droplet รวมเป็นกลุ่มเดียว และที่ 57.2 °C และ 55.5 °C เริ่มมี droplet แยกเป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่ชัดเจน ส่วนที่ 50.0 – 53.5 °C สามารถแยกกลุ่ม negative droplet และ positive droplet ออกจากกันได้มากขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 50 °C แยกได้ชัดเจนมากที่สุด (ภาพที่ 2) จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 50 °C สำหรับการทดลองต่อไป



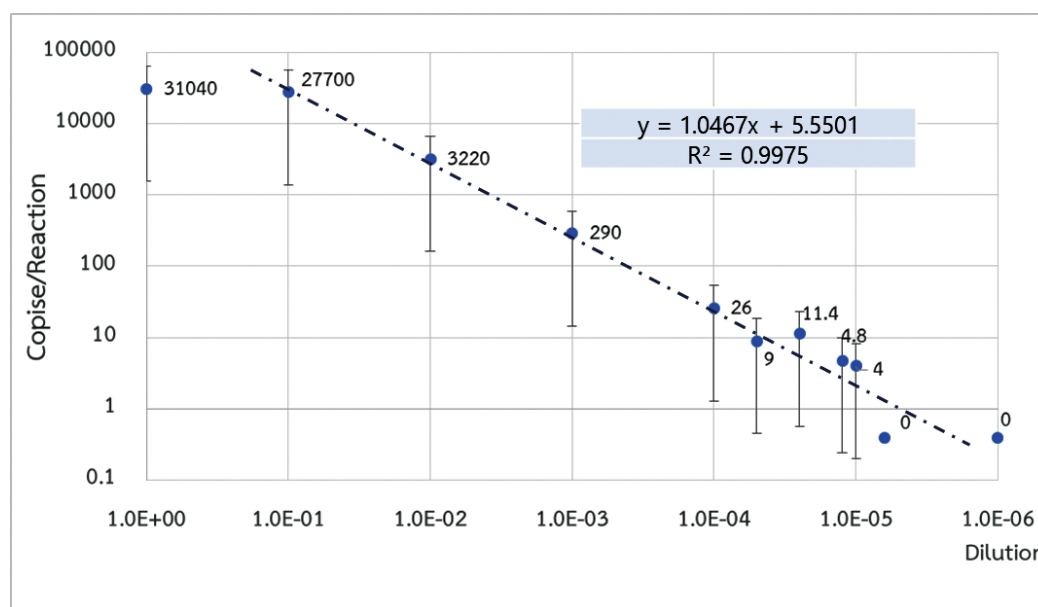
ภาพที่ 2 แสดง One-dimensional scatter plots ของ droplet ที่ให้ผลบวก (สีน้ำเงิน) และผลลบ (สีดำ) ด้วยวิธี RT-ddPCR ที่ใช้อุณหภูมิ annealing/extension ที่ 59.0, 57.2, 55.5, 53.5, 51.7 และ 50.0 °C

การทดสอบช่วงความสามารถในการตรวจวิเคราะห์

การตรวจตัวอย่าง SAR-S-CoV-2 RNA ที่มีค่า Ct เท่ากับ 20.31 จากวิธี real-time RT-PCR โดยเจือจางที่อัตราส่วน 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/20,000, 1/40,000, 1/80,000, 1/100,000, และ 1/1,000,000 ก่อนตรวจวัดปริมาณยีน *RdRp* ด้วย RT-ddPCR ได้ค่า copies/reaction ดังแสดงในตารางที่ 1 การ plot กราฟผลการทดลองพบว่ามีช่วงความสามารถในการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรง (linearity detection range) ที่ $R^2 = 0.9975$ อยู่ที่ 9 – 27,700 copies/reaction ซึ่งใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 μ l (เท่ากับ $1.8 \times 10^3 - 5.5 \times 10^6$ copies/ml ของ RNA sample) โดยมีค่าต่ำสุดของการวัดได้ที่ 4 copies/reaction (800 copies/ml ของ RNA sample) ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 1 จำนวน copies/reaction ของ SARS-CoV-2 ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสที่อัตราส่วนเจือจางต่างๆ และตรวจวัดยีน *RdRp* ด้วยวิธี RT-ddPCR

RNA sample dilution	positive droplet (number)	negative droplet (number)	copies/reaction (95% CI*)
1	10,793	3,937	31,040 (32,592-29,488)
1:10	10,891	4,851	27,700 (29,085-26,315)
1:100	1,533	10,486	3,220 (3,381-3,059)
1:1,000	169	13,598	290 (304-275)
1:10,000	17	15,491	26 (27-24)
1:20,000	4	10,415	9 (9.45-8.55)
1:40,000	7	14,555	11.4 (11.97-10.85)
1:80,000	3	14,558	4.8 (5.04-4.56)
1:100,000	2	11,492	4 (4.2-3.8)
1:1,000,000	0	16,081	0



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการเจือจางของตัวอย่างอาร์เอ็นเอกับปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดยการตรวจยีน *RdRp* ด้วยวิธี RT-ddPCR

อัตราส่วนการเจือจางของตัวอย่างอาร์เอ็นเอเปรียบเทียบกับค่า Ct ที่ได้จาก real-time RT-PCR

ทดสอบอัตราส่วนการเจือจางของตัวอย่างอาร์เอ็นเอก่อนการทำ RT-ddPCR โดยตรวจวัดจำนวนยีน *RdRp* ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่มีค่า Ct เท่ากับ 18.24 นำมาเจือจางที่ 1/10,000 และ 1/1,000 ส่วนตัวอย่างที่มีค่า Ct เท่ากับ 24.08 นำมาเจือจางที่ 1/100 และ 1/10 และตัวอย่างที่มีค่า Ct เท่ากับ 28.32 นำมาเจือจางที่ 1/10 จากผลการทดลองพบว่า จำนวน copies/reaction ที่ได้มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนการเจือจาง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวน copies/reaction ของ SARS-CoV-2 จากการตรวจหาปริมาณด้วยวิธี RT-ddPCR ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่มีค่า Ct จากการทำ real-time RT-PCR

sample ID	real-time RT-PCR (Ct)	dilution of RNA sample	RT-ddPCR* (copies/reaction)
A	18.24	1: 1000, 1:10000	7480, 702
B	24.08	1:10, 1:100	11540, 922
C	28.32	1:10	1180

* ค่า copies/reaction ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 µl และใช้ปริมาตร 20 µl ในการทำ RT-ddPCR

การเปรียบเทียบปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 จากวิธี RT-ddPCR กับ real-time RT-PCR ในตัวอย่างผู้ติดเชื้อ

ทดลองใช้วิธี ddPCR ด้วยพารามิเตอร์ที่ทดสอบได้ในการวัดค่าปริมาณไวรัสในตัวอย่างอาร์เอ็นเอของผู้ติดเชื้อจำนวน 21 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่เหลือจากการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR พบว่าค่า copies/reaction มีความสัมพันธ์กับค่า Ct โดยมีค่า $R^2 = 0.9392$ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากผู้ติดเชื้อด้วยวิธี RT-ddPCR เปรียบเทียบกับค่า Ct ที่ได้จาก real-time PCR

Sample code	Clinical sample type*	real-time RT-PCR (Ct)	RT-ddPCR** (Copies/reaction)
#1	saliva	Undetermined	0
#2	saliva	28.21	760
#3	saliva	Undetermined	9
#4	saliva	23.35	22,000
#5	NPS/NS	27.67	940
#6	NPS/NS	27.67	3,400
#7	NPS/NS	21.19	56,000
#8	NPS/NS	20.22	80,000
#9	NPS/NS	22.49	24,800
#10	NPS/NS	18.55	454,000
#11	NPS/NS	24.68	12,000
#12	NPS/NS	26.78	4,600
#13	NPS/NS	25.49	20,600
#14	NPS/NS	27.68	880
#15	NPS/NS	13.54	5,280,000
#16	NPS/NS	Undetermined	0
#17	NPS/NS	29.72	150
#18	NPS/NS	34.94	36
#19	NPS/NS	23.76	16,600
#20	NPS/NS	26.95	1,360
#21	NPS/NS	20.94	82,000

*NSP = *nasopharyngeal swab, NS = nasal swab, Ct = Cycle threshold

**เจือจางตัวอย่างที่มีค่า Ct ≥ 25 ที่ 1:1,000 ก่อนการทำ RT-ddPCR ค่าที่ได้เป็นค่าที่ปรับผลการเจือจางแล้ว

วิจารณ์

วิธี RT-ddPCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจปริมาณสารพันธุกรรม โดยสามารถระบุค่าปริมาณไวรัสในแต่ละตัวอย่างเป็นจำนวน copy ได้โดยไม่ต้องทำ standard curve นำไปใช้ตรวจตัวอย่างมาตรฐานหรือตัวอย่างอ้างอิงเพื่อใช้ประเมินคุณภาพวิธีตรวจทาง molecular technique ซึ่งไม่สามารถใช้ค่า plaque forming unit (PFU) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์สำหรับระบุปริมาณสารพันธุกรรมได้ เนื่องจากไวรัสที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ได้ต้องมีคุณสมบัติเพิ่มขยายจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง (viability) ค่า PFU จึงมีค่าต่ำกว่าค่า copy ที่ได้จากการตรวจทาง molecular technique ซึ่งเป็นการตรวจวัดสารพันธุกรรมทั้งหมดในตัวอย่างทั้ง โดยรวมอนุภาคไวรัสที่ยังเพิ่มจำนวนได้ อนุภาคไวรัสที่มีสารพันธุกรรมแต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน (defective viral particle) และสารพันธุกรรมที่หลุดออกจากอนุภาคไวรัสที่แตก ในการศึกษาครั้งนี้ค่าปริมาณไวรัสจากเทคนิค RT-ddPCR คำนวณเป็นปริมาณไวรัสในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ได้เท่ากับ 5.54×10^6 copies/ml ซึ่งมากเป็น 55 เท่าของค่า PFU ที่ระบุไว้ (2×10^5 PFU/ml) วิธี RT-ddPCR ที่พัฒนามีช่วงการตรวจที่ยังเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 9–27,700 copies/reaction (เท่ากับ 1.8×10^3 – 5.5×10^6 copies/ml RNA sample) และมีค่าต่ำสุดของการตรวจวัดอยู่ที่ 4 copies/reaction (800 copies/ml RNA sample) เปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในจีน⁽¹⁴⁾ ซึ่งใช้ชุดน้ำยา COVID-19 digital PCR detection kit (TargetingOne (Corp. China) ตรวจยีน *ORF1ab* และ *N* ของ SARS-CoV-2 ที่พบว่ามีค่าการตรวจวัดปริมาณ SARS-CoV-2 อยู่ในช่วง 200–50,000 copies/reaction และมีค่าต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 2.18 copies/reaction: ซึ่งค่าที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากการตรวจที่ใช้ชุดน้ำยาและยื่นเป้าหมายต่างกัน

ข้อจำกัดของวิธี RT-ddPCR คือ ในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสเข้มข้นมากจะทำให้ขั้นตอนในการเตรียม droplet มีสารพันธุกรรมเป้าหมายมากกว่า 1 copy อยู่ใน droplet เดียวกัน จึงเกิดการกระจายของสารพันธุกรรมเป้าหมายไม่เป็น Poisson distribution ค่าปริมาณที่ตรวจวัดได้จึงต่ำกว่าค่าจริง ดังนั้นหากทราบค่า Ct จากการทำ real-time RT-PCR ก่อนจะช่วยให้อัตราการการเจือจางตัวอย่าง RNA ก่อนการทำ RT-ddPCR จากการศึกษานี้มีข้อเสนอแนะว่า ถ้าค่า Ct น้อยกว่า 25 ควรเจือจางตัวอย่าง 1:1,000 ก่อนทำการตรวจวัดปริมาณ ส่วนในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณไวรัสต่ำมาก ค่าจำนวน copy ที่ตรวจวัดได้จะมีความแปรปรวนสูง เนื่องจากวิธี ddPCR เป็นวิธีที่ค่อนข้างใหม่น้ำยาที่ใช้ถูกผลิตจากบริษัทเดียวกับชุดเครื่องมือตรวจโดยเฉพาะน้ำยาชนิด one-step RT-PCR ที่มีน้ำยาจากผู้ผลิตอื่นจำกัด รวมทั้งขั้นตอนการตรวจที่ต้องการอุปกรณ์จำเพาะในการทำ partition ทำให้วิธี ddPCR มีค่าใช้จ่ายต่อปฏิกิริยาสูงกว่าวิธี real-time PCR ประมาณ 10 เท่า แต่ข้อดีของเทคนิคการตรวจคือไม่ต้องทำหลายซ้ำ (replicate) และไม่ต้องการ standard curve จึงทำให้ประหยัดกว่า

การทำ ddPCR มีการเพิ่มปริมาณยื่นเป้าหมายเช่นเดียวกับวิธีการตรวจด้วยหลักการ PCR ที่มีข้อควรระวังเรื่องการปนเปื้อนของ PCR product ในการทดสอบก่อนหน้า โดยต้องมีมาตรการป้องกันการปนเปื้อนที่รัดกุมเพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอม (false positive)

ปัจจัยรบกวนที่ส่งผลต่อความถูกต้องของค่าปริมาณไวรัสที่สำคัญคือตัวอย่างส่งตรวจ ในกรณีของ SARS-CoV-2 ที่ใช้ NPS/NP จุ่มใน viral transport medium (VTM) นั้น กระบวนการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งอาจจะ swab บริเวณที่มีเชื้อออกมาไม่เท่ากัน และกรณีที่เป็นตัวอย่างน้ำลาย จะไม่สามารถกำหนดปริมาตรน้ำลายที่เก็บได้ก่อนผสมกับ VTM ซึ่งแตกต่างกันจากการวัดค่าปริมาณไวรัสกลุ่มที่มีการขับไวรัสเข้าในกระแสเลือด เช่น human immune deficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV) และ hepatitis C virus (HCV) เป็นต้นที่สามารถกำหนดปริมาตรตัวอย่างพลาสมาเริ่มต้นก่อนสกัดสารพันธุกรรมได้แน่นอนกว่า ทำให้การตรวจวัดและ/หรือการเปรียบเทียบค่าปริมาณไวรัสในตัวอย่างที่เก็บต่างช่วงเวลาจากผู้ติดเชื้อรายเดียวกันมีค่าน่าเชื่อถือมากกว่า นอกจากนี้วิธีการสกัดสารพันธุกรรมก็เป็นปัจจัยในการทำให้เกิดความแปรปรวนในการสกัด ชุดสกัดสารพันธุกรรมแต่ละผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพในการสกัดสารพันธุกรรมและกำจัดตัวยับยั้ง (inhibitor) ของการทำ ddPCR ได้ต่างกัน ดังนั้นจึงควรทดสอบชุดสกัดก่อนและใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมจากบริษัทผู้ผลิตเดียวกันตลอดการศึกษาวิจัย

สรุป

การตรวจหาปริมาณ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค RT-ddPCR ที่ได้มีการศึกษาในครั้งนี้ สามารถตรวจหาไวรัสได้ต่ำสุดถึง 4 copies/reaction (800 copies/ml RNA sample) มีขั้นตอนการทำให้เป็น single-step RT-PCR และไม่ต้องการเปรียบเทียบกับตัวอย่างมาตรฐานโดยการทำให้ standard curve จึงสะดวกและเหมาะสมในการตรวจหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างอ้างอิงเพื่อการประเมินคุณภาพชุดตรวจ/ห้องปฏิบัติการ และการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจทางโมเลกุล รวมทั้งการประยุกต์ใช้ตรวจหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 เพื่อติดตามการรักษาคอนไซ COVID-19 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการอนุเคราะห์น้ำเลี้ยงเซลล์เพาะเชื้อ SARS-CoV และข้อมูลลำดับเบสของ RdRp primer และ probe

เอกสารอ้างอิง

1. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 2020; 395: 470-3.
2. WHO/2019-nCoV/Surveillance/v2020.1. Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV): interim guidance v1, January 2020. Geneva: World Health Organization; 2020.
3. 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.
4. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181(2): 271-80.
5. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Muller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020; 581: 465-9.
6. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 30]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
7. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(16): 9236-41.
8. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods* 2013; 10(10): 1003-5.
9. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: a technology review. *Sensors (Basel)*. 2018; 18(4): 1271. (27 pages).

10. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin Chem* 2013; 59(6): 892-902.
 11. Pohl G, Shih IM. Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4(1): 41-7.
 12. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 2011; 83(22): 8604-10.
 13. Caviglia GP, Abate ML, Tandoi F, Ciancio A, Amoroso A, Salizzoni M, et al. Quantitation of HBV cccDNA in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: a new tool to detect occult infection. *J Hepatol* 2018; 69(2): 301-7.
 14. Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. *Clin Infect Dis* 2020; 71(15): 793-8.
-

Establishment of SARS-CoV-2 Quantification by Reverse Transcription Droplet Digital PCR

**Nuanjun Wichukchinda Natthakul Bunnueang Wimala Inunchot Waritta Sawaengdee
and Surakameth Maharisimongkol**

*Division of Genomics Medicine and Innovation Support, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road,
Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT Pandemic of SARS-CoV-2 affects global health, social, and economic system. Research and development in sciences and medicine involving diagnosis, therapy, and vaccine has been intensively focused to control this contagious virus. Quantification of SARS-CoV-2 viral load is important for studying pathology and monitoring treated patients, and also for standard RNA preparation. Quantitative real-time PCR technique has low accuracy, high variability, and required standard calibration in every run. Here, we reported the development of reverse-transcription droplet digital PCR (RT-ddPCR) method for SAR-CoV-2 detection which can absolutely quantitate the virus by detecting *RNA dependent RNA polymerase (RdRp)* gene as low as 800 copies/ml with linearity of detection at 1.8×10^3 to 5.54×10^6 copies/ml of RNA sample. This method can be applied to measure SARS-CoV-2 in both reference RNA and clinical samples. Further improvement in quality of biological samples in term of collection method and preservation will support the accuracy of the viral load assay.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, quantification, RT-ddPCR

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 ปฏิบัติการ 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 ทั้งการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำ 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

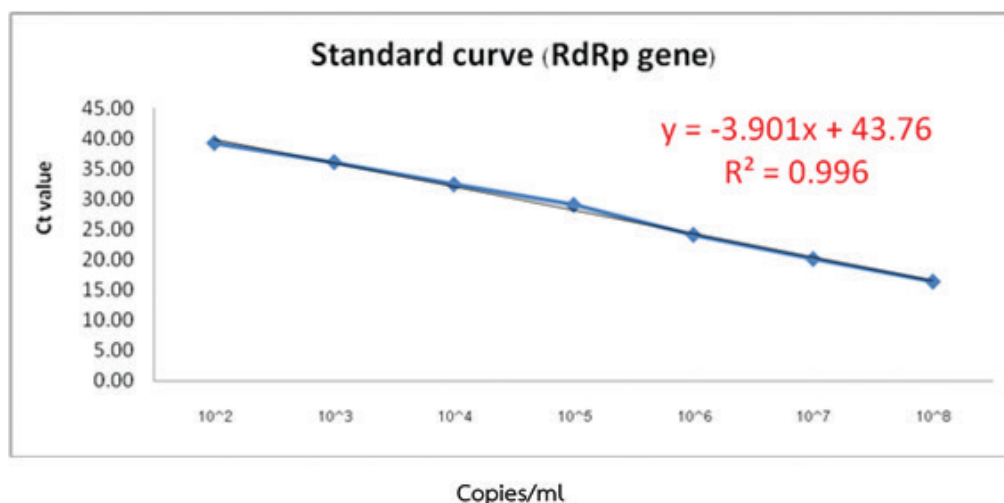
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้ทำการประเมินชุดน้ำยาดดังกล่าว เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและคุณภาพให้เป็นไปตามมาตรฐาน โดยจะเป็นประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการในการพิจารณาเลือกใช้ชุดน้ำยาได้อย่างมั่นใจ และสอดคล้องกับมาตรฐานที่กำหนด

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 สำหรับชุดน้ำยาที่ต้องประเมิน โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด RNA ทดสอบโดยใช้ culture supernatant ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ โดยวิธี heat inactivation ที่อุณหภูมิ 56° Celsius (°C) นาน 30 นาที⁽¹⁰⁾ มาทำการเจือจางจำนวน 5 ความเข้มข้น เช่นเดียวกัน 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 ชนิด ที่นำมาทดสอบนี้

การประเมินคุณภาพชุดน้ำยา

การประเมินเอกสารกำกับชุดน้ำยาและกล่องบรรจุ พิจารณาจากรายละเอียดข้อบ่งชี้การใช้งาน เกณฑ์การอ่านผล การแปลผลที่ชัดเจน มีข้อมูลการทดสอบความถูกต้องของวิธี (validation data) ความไวเชิงวิเคราะห์ ต้องกำหนดค่า 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) เมื่อชุดน้ำยาให้ผลบวกกับตัวอย่างลำดับที่ 6-10 ทั้ง 3 การทดสอบซ้ำ โดยมีความสอดคล้องของตัวอย่างลบเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อให้ผลลบ 15 จาก 15 การทดสอบ

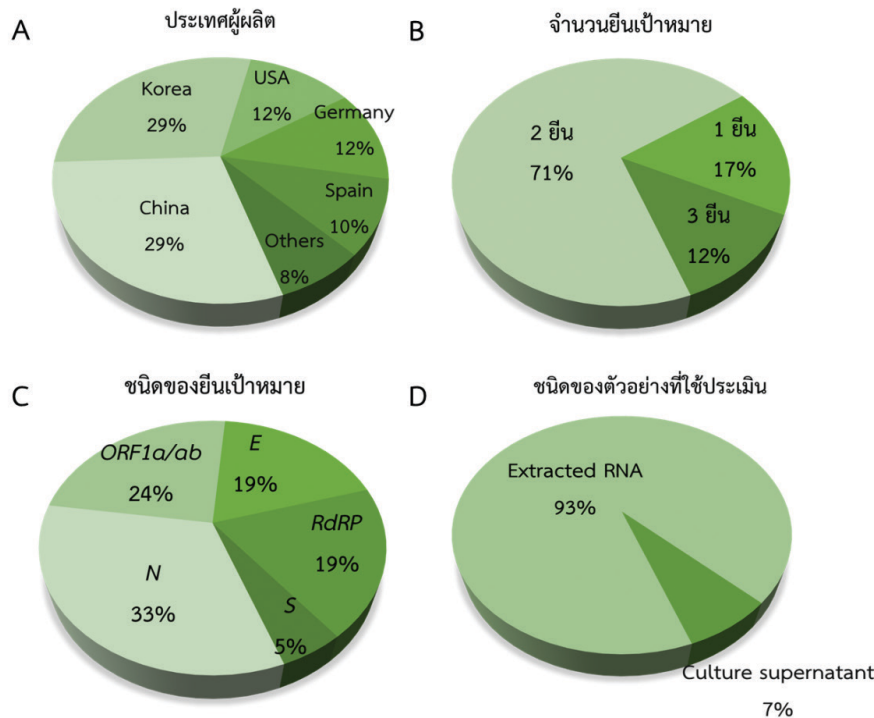
ตารางที่ 1 ชนิดของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบปริมาณ copies/ml ในแต่ละตัวอย่างจากการคำนวณเทียบกับ standard calibration curve และเกณฑ์การทดสอบ

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)

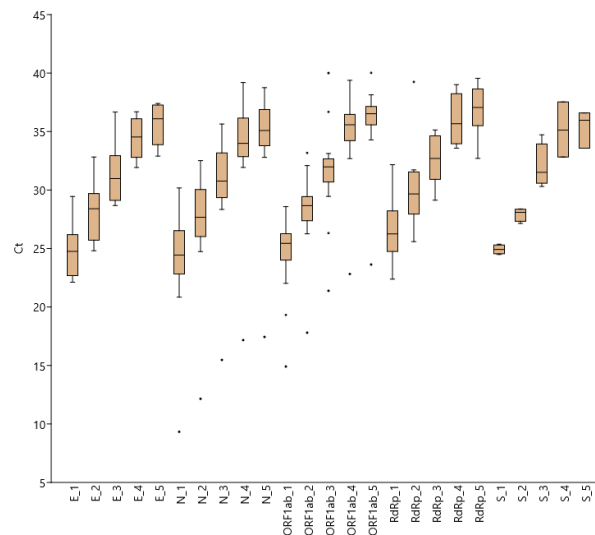
ผลประเมิน	จำนวนครั้งที่ทดสอบผ่าน (ความสอดคล้อง)	จำนวนชุดน้ำยา (ร้อยละ)
ความไว - ผ่านเกณฑ์	15 จาก 15 การทดสอบ (ร้อยละ 100)	30 (ร้อยละ 73)
	14 จาก 15 การทดสอบ (ร้อยละ 93)	2 (ร้อยละ 5)
	13 จาก 15 การทดสอบ (ร้อยละ 87)	3 (ร้อยละ 7)
	12 จาก 15 การทดสอบ (ร้อยละ 80)	1 (ร้อยละ 3)
ความไว - ไม่ผ่านเกณฑ์	น้อยกว่า 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 ต่อ ยีน *RdRp* นั้นสูงกว่ายี่ห้ออื่นในทุกตัวอย่าง 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) <i>N-gene</i>	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 Biopurfectus 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* ของตัวอย่างนั้นต่ำกว่าค่า *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

การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 ในประเทศไทย

อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์ วิโรจน์ พงษ์ทับทิม กฤษณ์ชัย จันทเพ็ชร วรางลักษณ์ พิมพากัย ทศนีย์ ไชยคำ
สุนิดา เสนาวรานนท์ ชญาดา ทองคำแสน จีรภา ศิลาเกษ คณิศร ลาภอดิศร สกฤษรัตน์ สุนทรฉัตรวิวัฒน์
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 โดยการใช้ชุดตัวอย่างมาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้มีความเหมาะสม 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 หรือเป็นผู้ป่วยที่ผู้เข้าเกณฑ์ตามนิยาม 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

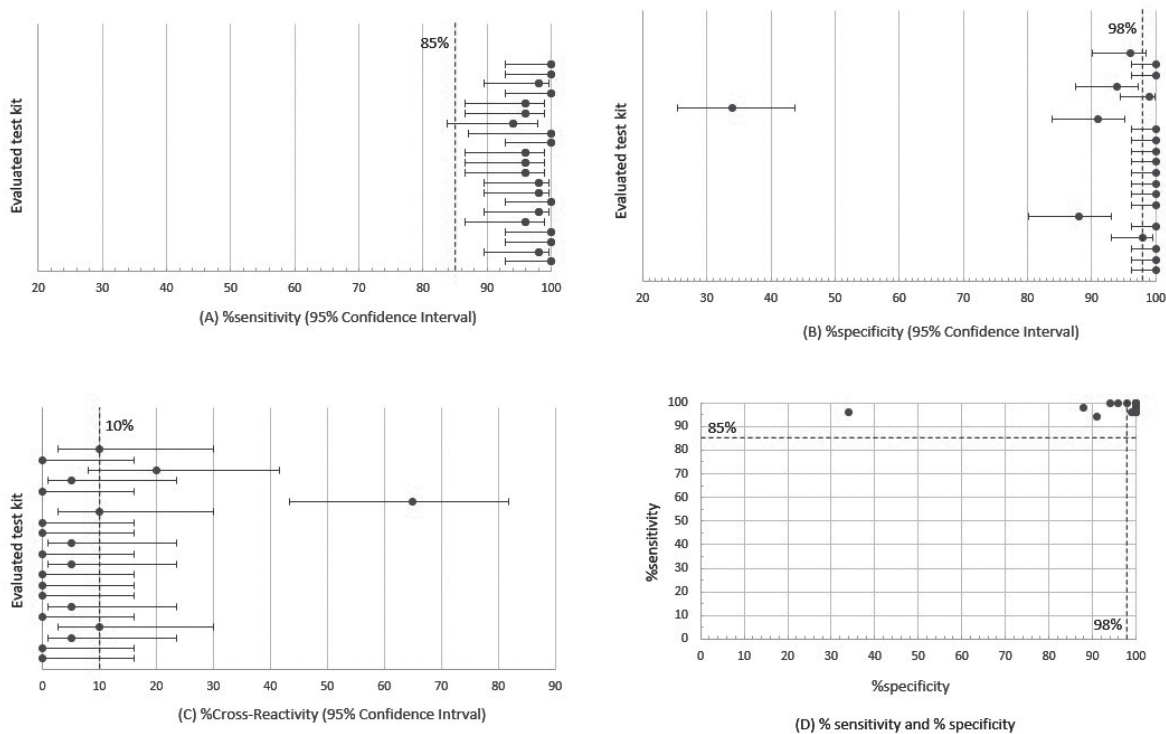
ลักษณะของชุดทดสอบที่ส่งให้ประเมิน (n=21)	จำนวน	ร้อยละ
ประเภทลักษณะชุดทดสอบ		
- Rapid test Assay	14	66.7
- Machine Base Assay	7	33.3
หลักการทดสอบ		
- Immunochromatography	14	66.7
- Chemiluminescence Immunoassay (CMIA)	5	23.8
- Electro Chemiluminescence Immunoassay (ECLIA)	2	9.5
องค์ประกอบแอนติเจนที่ใช้ในชุดทดสอบ		
- 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 ซึ่งสาเหตุที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินเป็นผลมาจากการทดสอบหาความจำเพาะเชิงวินิจฉัย ที่ทดสอบในกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อ SAR CoV-2 ให้ผลบวกปลอม (False positive) เกินเกณฑ์มาตรฐานของ อย. ซึ่งชุดทดสอบให้ผลบวกปลอมสูงอาจส่งผลให้ค่าความไวของชุดทดสอบสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้ข้อมูลจากผู้ประกอบการส่วนใหญ่ ไม่ได้ระบุถึงชนิดหรือประเภทของการเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในชุดทดสอบ 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

การเตรียมชุดตัวอย่างสำหรับการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงของประเทศไทย

วิโรจน์ พวงทับทิม กฤษณ์ชัย จันทเพ็ชร วรางลักษณ์ พิมพ์ภักย์ ทศนีย์ ไชยคำ สุวนิดา เสนาวรานนท์ ชญาดา ทองคำแสน จีรภา ศิลาเกษ คณิศร ลาภอดิศร สกฤษรัตน์ สุนทรฉัตรวัฒน์ ปนัดดา เทพอัศธร และอาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (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 เพราะเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของตัวเชื้อ⁽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 โดยรับคำขอประเมินและออกใบรับรองการประเมินชุดตรวจและน้ำยาที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ให้กับบริษัทที่นำเข้าชุดน้ำยาจากต่างประเทศหรือผลิตเองภายในประเทศโดยจะต้องได้รับการประเมินทางห้องปฏิบัติการโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 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), ภูมิคุ้มกันบกพร่อง และผู้มีโรคประจำตัวอื่น ๆ เป็นต้น

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

วัสดุและวิธีการ

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 หรือเป็นผู้ป่วยที่ผู้ที่เกี่ยวข้องตามนิยาม (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 และภาวะตั้งครรภ์ เป็นต้น จำนวน 37 ราย

การสำรวจข้อมูลและวางแผนการเก็บตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างประเมินความไวเชิงวินิจฉัย สํารวจหน่วยงาน/โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ที่ตั้งอยู่ในจังหวัดใกล้เคียงกับที่ตั้งของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เช่น โรงพยาบาลในจังหวัดนนทบุรี นครปฐม สมุทรปราการ สมุทรสงคราม และชลบุรี เพื่อทราบจำนวนผู้ติดเชื้อที่เข้ามารับบริการ 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) โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในชุดตัวอย่างลบนี้ใช้เกณฑ์ผลการตรวจเป็นลบในทุกรายการทดสอบดังกล่าว และไม่มีประวัติการเจ็บป่วย ณ ช่วงเวลาที่เจาะเก็บเลือด ไม่มีประวัติเสี่ยง/ประวัติสัมผัส หรือเป็นผู้ป่วยที่ผู้ที่เข้าเกณฑ์ตามนิยาม 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 และเมื่อนำมาสุ่มตัวอย่าง เพื่อขอเก็บตัวอย่างนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่ความผิดพลาด 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/อาสาสมัครที่นำมาตรวจคุณสมบัติเฉพาะ (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 ตัวอย่าง ที่มีระดับ PRNT titer มากกว่า 100 แต่เมื่อนำผลการตรวจ Total IgG/IgM ด้วยเทคนิค chemiluminescence

และ ELISA โดยใช้ผลการตรวจที่สอดคล้องกันทั้ง 3 วิธีมาพร้อมด้วย 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 เนื่องจากประเทศไทยมีอุปสรรคการติดเชื้อในประเทศค่อนข้างต่ำ⁽¹⁰⁾ ทำให้การค้นหาผู้ติดเชื้อ และการเข้าเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาขึ้นดำเนินการได้ยาก ซึ่งต้องปฏิบัติตามหลักการป้องกัน และการกระจายแพร่เชื้อ (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 หรือเคยสัมผัสเชื้อนี้มาก่อนแต่ร่างกายสามารถกำจัดเชื้อนี้ให้หมดไปได้ 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) แต่อย่างไรก็ตามการจัดเตรียมผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์อื่นไม่ว่าจะเป็น 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 สำหรับการทดสอบเพื่อหาแอนติบอดีเชิงปริมาณสามารถเก็บในระยะเวลาสั้น⁽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 องค์การผู้เชี่ยวชาญ 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 มาตรฐานของเครื่องมือแพทย์ ที่ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าต้องปฏิบัติ 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

การทดสอบความชำนาญเพื่อขึ้นทะเบียนห้องปฏิบัติการ เครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจวินิจฉัย SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR

สุนทรียา วัชรเจริญ¹ พิไลลักษณ์ อัครไพบุลย์ โอภาตะ¹ สิริพรรณ แสงอรุณ¹ คำแพว บัวใหญ่¹ สิริชล กาละ¹
ดนตรี ช่างสม¹ ชันธิ์ทิวา ชัยราช¹ รัตนระวี บุญเมือง¹ นันทวรรณ เมฆา¹ มาลินี จิตตกานต์พิชัย²
และบัลลังก์ อุปพงษ์¹

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ 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 ที่ยื่นเป้าหมาย E มีความไวสูงกว่า 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) การแพร่ระบาดส่งผลกระทบต่อทั่วโลกถึง 188 ประเทศ ซึ่งในเดือนกรกฎาคม 2563 มีผู้ติดเชื้อมากกว่า 14 ล้านคนแล้ว องค์การอนามัยโลกได้นำวิธี real-time PCR สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง^(1, 2) ขั้นตอนการทดสอบคือ ใช้ชุดน้ำยาสกัดยีนโนมของไวรัสซึ่งเป็นชนิด 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 เพื่อดำเนินการอย่างมีประสิทธิภาพ 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 แยกเซลล์ออกเป็นเซลล์เดี่ยว 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 และส่งรายงานผลกลับทางอีเมลภายใน 3 วัน ซึ่งการรายงานผลประกอบด้วยข้อมูลชื่อชุดน้ำยา สกัดอาร์เอ็นเอ ชื่อชุดน้ำยา real-time PCR รายงานผลเป็นผลบวกหรือผลลบ พร้อมระบุค่า Ct แยกตามยีนเป้าหมาย

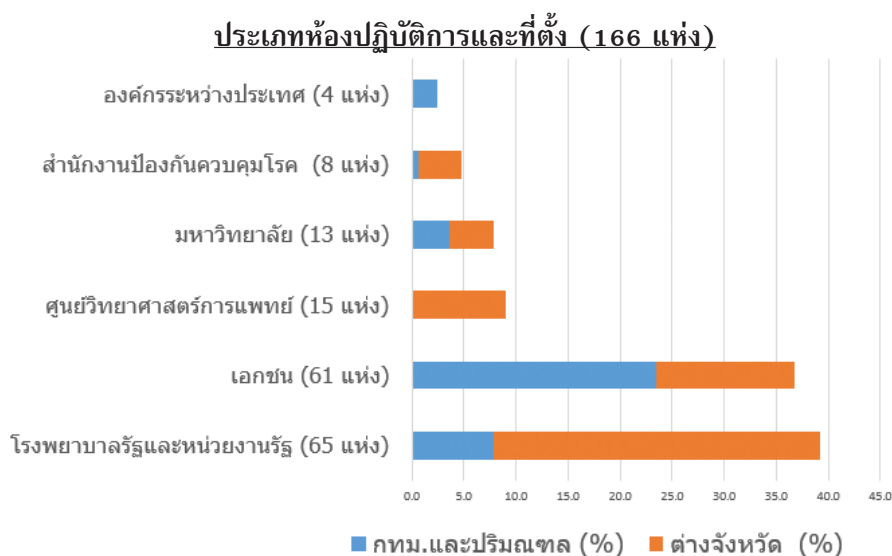
การประเมินผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

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

การจำแนกชุดน้ำยา สกัดสารพันธุกรรมและน้ำยา real-time PCR ที่ห้องปฏิบัติการใช้

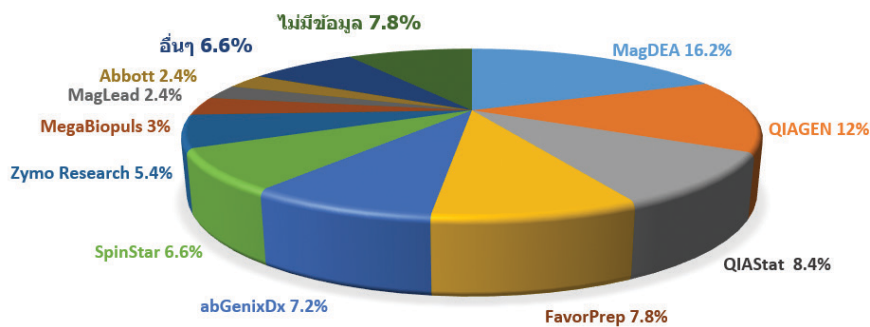
สมาชิกห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญตรวจเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time PCR จำนวนทั้งหมด 166 ห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็นห้องปฏิบัติการในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑลจำนวน 63 แห่ง และต่างจังหวัด จำนวน 103 แห่ง แบ่งเป็นหน่วยงานจากภาครัฐ โรงพยาบาล มหาวิทยาลัยและภาคเอกชน รายละเอียดแสดงในภาพที่ 1



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)

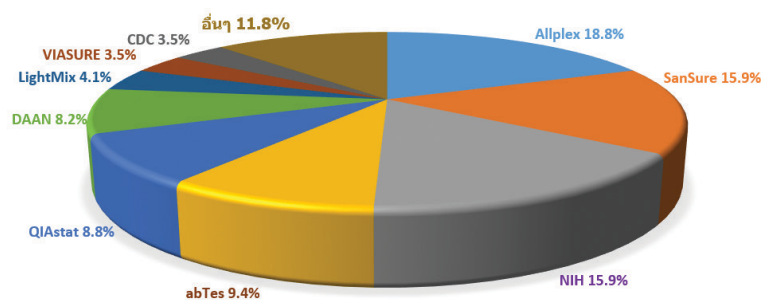
ชุดน้ำยาสกัด RNA EXTRACTION KIT (%)



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 *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

ชุดน้ำยา real-time PCR KIT (%)



ภาพที่ 3 ชุดน้ำยา real-time PCR ที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้

ผลการประเมินความสามารถทางห้องปฏิบัติการ

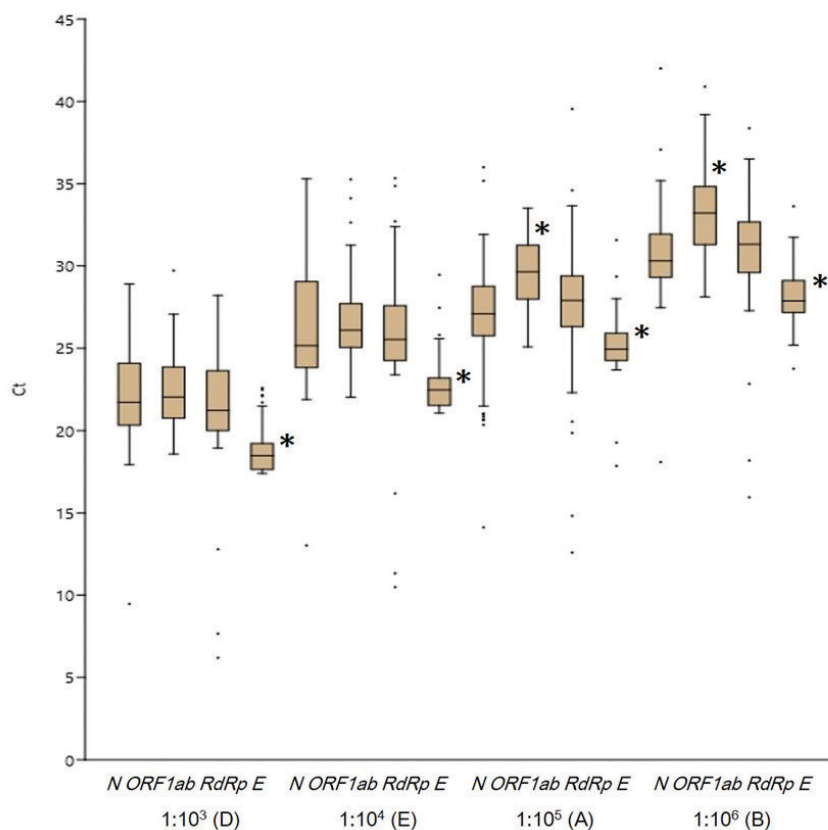
จากจำนวนห้องปฏิบัติการ 166 แห่ง ที่สมัครเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญพบว่า ห้องปฏิบัติการจำนวน 164 แห่ง (ร้อยละ 98.8) ผ่านการประเมิน คือ ตอบผลถูกต้องตามค่ากำหนดในวัตถุทดสอบทั้งหมดจำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 อีก 2 แห่ง (ร้อยละ 1.2) อยู่ในเกณฑ์ที่ต้องปรับปรุง ซึ่งสมาชิกที่ต้องปรับปรุงได้รับชุดวัตถุทดสอบใหม่ 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 ผลิตรหัส)

ตัวอย่าง	เชื้อและความเข้มข้น	ผลถูกต้อง (%)	ชื่อชุดน้ำยา	Ct (Mean±SD) , 165 ข้อมูลที่รายงานค่า Ct					จำนวนแยกตามน้ำยาและยี่ห้อ
				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

ผลการวิเคราะห์ความไวของการตรวจยืนยันเป้าหมายจากค่า Cycle threshold (Ct)

การประเมินความสามารถทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค real-time PCR วัตถุประสงค์เพื่อหาค่า Cycle threshold (Ct) และ ค่า Cut-off ที่แต่ละชุดน้ำยาส่งเกตให้ โดยค่า Ct น้อยกว่าค่า Cut-off ถือว่าให้ผลบวกหรือพบยืนยันเป้าหมาย ในทางกลับกัน ค่า Ct มากกว่าค่า Cut-off ถือว่าให้ผลลบหรือไม่พบยืนยันเป้าหมาย ค่า Ct จึงเป็นค่าผกผันกับความเข้มข้นของไวรัส และสามารถประมาณการค่าความแรงของเชื้อในตัวอย่างได้ เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า Ct จากจำนวนทั้งหมด 165 ข้อมูล (ห้องปฏิบัติการแห่งหนึ่งใช้เทคนิคที่แตกต่าง ไม่มีค่า Ct แต่ให้รายงานผลถูกต้องทั้งหมด) พบว่าชุดน้ำยาโดยส่วนใหญ่มีค่า Ct สอดคล้องกับความเข้มข้นของไวรัส ส่วนการเปรียบเทียบว่ายืนยันใดมีความไวในการตรวจพบเชื้อ SARS-CoV-2 พิจารณาจากค่าสัญญาณในการตรวจพบ หากค่า Ct ต่ำ หมายถึงมีเชื้อไวรัสตั้งต้นมากหรือชุดตรวจมีความไวสูงในการตรวจพบ รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างวัตถุทดสอบกับค่า Ct ของแต่ละยี่ห้อ โดยใช้ข้อมูลรวมของชุดน้ำยา 6 ชุด



ภาพที่ 4 การกระจายของค่า Ct เปรียบเทียบกับยี่ห้อเป้าหมาย *N*, *ORF1ab*, *RdRp*, *E* และตัวอย่างทดสอบที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ Boxplot แสดงความหนาแน่นและการกระจายของข้อมูลค่า Ct จากการทดสอบ แกน y แสดงค่า Ct แกน X แสดงความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบ โดยในแต่ละตัวอย่างได้แยกเป็น 4 กลุ่มยี่ห้อ จากข้อมูลชุดน้ำยา 6 ชุด ที่มีห้องปฏิบัติการใช้มากที่สุด ใน Boxplot แสดงค่ามัธยฐาน (Median) เป็นค่ากลาง ตำแหน่งการกระจายของข้อมูลแสดงโดยค่าควอไทล์ที่ 1 (ขอบล่าง) และควอไทล์ที่ 3 (ขอบบน) เครื่องหมาย* แสดงยี่ห้อที่มีค่า Ct เฉลี่ยแตกต่างกับยี่ห้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann-Whitney U Test, p value < 0.01) เมื่อเปรียบเทียบในตัวอย่างเดียวกัน ชุดน้ำยาที่มียี่ห้อเป้าหมายเป็น ยี่ห้อ *ORF1ab* นับรวม *ORF1ab*, *ORF1a*, *NS1*, *NS2* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนวิธี CDC มีการออกแบบ ยี่ห้อ *N* นับรวม *N1*, *N2* และ *N3* ส่วน *QIAStat* เป็นชุดน้ำยาที่การรายงานผลไม่ได้แยกค่า Ct ว่าเป็นของ ยี่ห้อ *RdRp* หรือ ยี่ห้อ *E*

ที่มีห้องปฏิบัติการใช้มากที่สุด (Allplex, Sansure, abTES, Thai NIH, DAAN และ QIAStat; ตารางที่ 1) ซึ่งมียื่นเป้าหมายคือยีน *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 จึงได้รวบรวมผลจากสมาชิกร่วมวิเคราะห์เพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงวิชาการ ซึ่งจะประโยชน์ในการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการ 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 กล่าวคือรายงานผลปลอมทั้งนี้อาจเกิดจากชุดน้ำยาสกัดตัวอย่างที่เลือกใช้ แต่ได้ปรับปรุงแก้ไขข้อผิดพลาดจนสามารถผ่านการประเมินในรอบที่ 2

ส่วนของการนำค่า Ct จากทุกตัวอย่างมาวิเคราะห์ในภาพรวมแยกตามยื่นเป้าหมายนั้น ผลการศึกษามีความสอดคล้องกับงานวิจัยในต่างประเทศที่พบว่า การตรวจหา *E gene* มีความไวสูงกว่ายีนอื่นๆ เนื่องจากไพรเมอร์และไพรบที่ชุดน้ำยาส่วนใหญ่ออกแบบจะเป็นตำแหน่งของลำดับเบสที่พบในกลุ่ม sarbeco virus (SARS-CoV-1 และ SARS-CoV-2) ส่วนยื่นเป้าหมายอื่นๆ 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 ทำให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีความสมบูรณ์

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-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>.
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 สำนักลัดกระทรงสาธารณสุข. 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 Waicharoen¹ Pilailuk Akkapaiboon Okada¹ Siriphan Saeng-aaron¹
Kampaew Buayai¹ Sirichol Kala¹ Don Changsom¹ Khanthiwa Chairad¹
Ratravee Boonmuang¹ Nanthawan Mekha¹ Malinee Chittaganpitch²
and Ballang Uppapong¹

¹National Institute of Health, ²Medical 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

การพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการรองรับการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019

พัทธนันท์ ธนพัฒน์ศิริกุล วรรณศุภี มาศจำรัส สุภาภรณ์ แซ่ตัน และจิราภรณ์ เพชรรักษ์
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

บทคัดย่อ จากการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โควิด -19) ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี จึงได้พัฒนาศักยภาพทางห้องปฏิบัติการทั้งภายในหน่วยงานและห้องปฏิบัติการเครือข่ายในเขตภาคใต้ตอนบน เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) และนำผลการตรวจวินิจฉัยใช้ในการสอบสวนโรค ฝ้าระวังโรค ซึ่งมีปัจจัยที่ต้องพัฒนา 7 ด้าน คือ สถานที่และสภาวะแวดล้อม บุคลากร เครื่องมือ น้ำยาและสารเคมี ระบบความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ วิธีการตรวจวิเคราะห์ และการรายงานผล ส่วนการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการเครือข่ายของโรงพยาบาลในเขตภาคใต้ตอนบนนั้น ดำเนินการโดยให้โรงพยาบาลประเมินความพร้อมด้านทรัพยากร และประเมินความสามารถด้วยตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจโรคโควิด-19 ผลการดำเนินงานทำให้ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี สามารถให้บริการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 โดยตั้งแต่วันที่ 28 มกราคม ถึง 30 เมษายน พ.ศ. 2563 มีตัวอย่างส่งตรวจทั้งสิ้น 2,324 ตัวอย่าง พบผลบวก 95 ตัวอย่าง และภายในเดือนเมษายน พ.ศ. 2563 มีห้องปฏิบัติการเครือข่าย 6 แห่ง สามารถตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ซึ่งทำให้สามารถร่วมมือกันตรวจจับการระบาดของโรคในเขตภาคใต้ตอนบนได้

คำสำคัญ โควิด-19, ศักยภาพห้องปฏิบัติการ, เครือข่ายห้องปฏิบัติการ

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

Received: 30 June 2020

Revised: 21 August 2020

Accepted: 28 August 2020

บทนำ

การแพร่ระบาดของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (novel coronavirus 2019, 2019-nCoV, SARS-CoV-2) ที่ก่อโรคปอดอักเสบ (pneumonia) ในเมืองอู่ฮั่น (Wuhan) มณฑลหูเป่ย์ (Hubei) ประเทศจีน เริ่มจากช่วงปลายปี ค.ศ. 2019 จนถึงปัจจุบัน พบผู้ป่วยโรคปอดอักเสบที่ไม่รู้สาเหตุในเมืองอู่ฮั่นเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ต่อมาได้มีการรายงานเป็นทางการเมื่อ 3 มกราคม ค.ศ. 2020 ว่าโรคปอดอักเสบที่ระบาดที่อู่ฮั่น มีสาเหตุจากไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (novel coronavirus 2019, 2019-nCoV) และพบการแพร่เชื้อจากคนสู่คนได้⁽¹⁾ ผู้เสียชีวิตเป็นผู้สูงอายุและผู้ที่มีโรคประจำตัวมีโอกาสเสี่ยงที่จะเสียชีวิตเพิ่มขึ้น โดยผู้ที่เป็โรคหัวใจมีอัตราการเสียชีวิตมากที่สุด ร้อยละ 10.5 รองลงมาคือ โรคเบาหวาน (ร้อยละ 7.3) และโรคระบบทางเดินหายใจเรื้อรัง (ร้อยละ 6.3)⁽²⁾

ไวรัส SARS-CoV-2 จัดอยู่ในตระกูลของเชื้อไวรัสโคโรนา เป็นไวรัสชนิด enveloped, positive stranded RNA virus อยู่ใน order Nidoviridae มี 4 subgroup ได้แก่ alpha coronavirus (coronavirus 229E, coronavirus NL63), beta coronavirus (coronavirus OC43, coronavirus HKU1, MERS-CoV และ SARS-CoV-2 จัดอยู่ใน subgroup beta coronavirus), gamma coronavirus และ delta coronavirus (coronavirus HKU11) เชื้อไวรัสโคโรนาหลายชนิดที่ก่อโรคในคน มีทั้งชนิดที่ก่อโรคไม่รุนแรง เช่น Coronavirus OC43, HKU1, 229E, NL63 และชนิดที่ก่อโรครุนแรง เช่น เชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (MERS-CoV) หรือเชื้อไวรัสโคโรนาที่ก่อโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (Severe acute respiratory syndrome: SARS)^(3, 4)

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โรคโควิด-19) เริ่มแพร่เข้าสู่ประเทศไทยตั้งแต่ต้นเดือนมกราคม พ.ศ. 2563⁽²⁾ โดยผู้เดินทางท่องเที่ยวจากเมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ ประเทศจีน จากนั้นเกิดการแพร่กระจายเชื้อผ่านผู้เดินทางจากประเทศจีนไปยังประเทศต่าง ๆ ในทุกภูมิภาคอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันทุกประเทศทั่วโลกกำลังพยายามควบคุมการระบาดภายในประเทศและเฝ้าระวังการนำเข้าจากต่างประเทศ การระบาดของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ขยายตัวไปทั่วโลกในลักษณะการระบาดใหญ่ (Pandemic) ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยยืนยันโรคติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยกว่าร้อยละ 60 เป็นผู้เดินทางมาจากต่างประเทศ และพบผู้ติดเชื้อของประเทศไทยในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง คือกลุ่มอาชีพที่ต้องสัมผัสกับนักท่องเที่ยวที่เดินทางมาจากพื้นที่ที่มีระบาด ได้แก่ พนักงานขับรถ มัคคุเทศก์ พนักงานในสถานบันเทิง พนักงานขายของตามสถานที่ที่มีนักท่องเที่ยวจำนวนมาก⁽²⁾

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เป็นหน่วยงานหลักในการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งมอบหมายให้ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั่วประเทศพัฒนาขีดความสามารถการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) เพื่อเป็นเครือข่ายของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการโต้ตอบภาวะฉุกเฉินของโรคอุบัติใหม่ข้างต้น ได้ทันการณ์ และนำข้อมูลผลการตรวจวินิจฉัยใช้ในการสอบสวนโรค เฝ้าระวังโรคในพื้นที่รับผิดชอบ การศึกษานี้เป็นการพัฒนาศักยภาพการตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 ของห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี และห้องปฏิบัติการเครือข่ายของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี เพื่อสนับสนุนการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคในพื้นที่รับผิดชอบ 4 จังหวัดภาคใต้ตอนบน ได้แก่ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมทรัพยากร

ทำการประเมินความพร้อมของบุคลากร เครื่องมือ น้ำยา สารเคมี วัสดุวิทยาศาสตร์ และสถานที่ของหน่วยงาน พร้อมทบทวนวิธีการและช่องทางการนำเข้าข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยเพื่อการรายงานผล รวมทั้งศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่ง primers และ

probes มีความจำเพาะกับ *N* gene และ *RdRp* อ่านผลเป็นการพบ/ไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัส SARS-CoV-2 โดยมี *RNase P* gene เป็น internal control⁽⁵⁾

การประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ก่อนเปิดบริการ

เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT PCR ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชุดตัวอย่างทดสอบประกอบด้วยตัวอย่างบวกและลบจำนวน 4 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ ห้องปฏิบัติการที่มีผลการทดสอบถูกต้อง 100% ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁾

ผล

ศักยภาพการตรวจโรคติดเชื้อโคโรนา 2019 ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี ทรัพยากรและกระบวนการทางห้องปฏิบัติการ

สถานที่และสภาวะแวดล้อม: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี ได้มีการเปิดให้บริการตรวจเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ Influenza virus, ไวรัสโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (MERS-CoV) โดยวิธี real time RT-PCR มีการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องตามหลักการสากลโดยแบ่งเป็น 3 พื้นที่ คือ ห้องสกัดสารพันธุกรรม ห้องเตรียมน้ำยา และห้องสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งถือว่าห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกมีความพร้อมในการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19)

บุคลากร: บุคลากรของห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกมีจำนวนทั้งสิ้น 5 คน ทั้งหมดมีความรู้ ทักษะและความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค real time PCR ประกอบด้วย (1) นักเทคนิคการแพทย์จำนวน 2 คน ประสบการณ์ทำงานเทคนิค real time PCR 6 และ 13 ปี (2) นักวิทยาศาสตร์การแพทย์จำนวน 2 คน ประสบการณ์ทำงานเทคนิค real time PCR 5 และ 10 ปี และ (3) เจ้าหน้าที่งานวิทยาศาสตร์การแพทย์จำนวน 1 คน ประสบการณ์ทำงานเทคนิค real time PCR 7 ปี

เครื่องมือ: เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์มีจำนวนเพียงพอ และผ่านการสอบเทียบประจำปีทุกปี ประกอบด้วย ตู้ปราศจากเชื้อ Class II type B จำนวน 1 เครื่อง automatic micropipette Microcentrifuge และ Heating block สำหรับใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม เครื่อง real time PCR จำนวน 2 เครื่อง คือ เครื่อง ABI รุ่น 7500 และ qtower 2.2 สำหรับใช้ในการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019

น้ำยาและสารเคมี: ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

ระบบความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ: ขั้นตอนการรับตัวอย่าง การตรวจวิเคราะห์ และการทำลายตัวอย่าง ส่งตรวจดำเนินการตามระบบคุณภาพและความปลอดภัยภายในห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี โดยปฏิบัติตามมาตรฐานสากล ISO 15190:2003⁽⁷⁾

วิธีการตรวจวิเคราะห์: จากการทดสอบวิธีวิเคราะห์ พบว่าค่า cycle threshold (Ct) ของตัวอย่างที่ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข เป็นไปตามเกณฑ์ (ตารางที่ 1) และผลการทดสอบความชำนาญสอดคล้องกับชุดตัวอย่างทดสอบที่ได้รับทั้งหมด

รายงานผลการตรวจวิเคราะห์: รายงานตามระบบ DDC-Covid-19 โดยกรณีผลลบ รายงานผลเป็นเอกสาร PDF file ไปยัง Situation Awareness Team (SAT) กรมควบคุมโรค SAT สำนักงานควบคุมป้องกันโรคที่ 11 นครศรีธรรมราช และ SAT สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดที่นำส่งตัวอย่าง และโรงพยาบาลที่นำส่งตัวอย่าง ส่วนกรณีผลบวก รายงานผลเป็นเอกสาร PDF file ไปยัง SAT กรมควบคุมโรค SAT สำนักงานควบคุมป้องกันโรคที่ 11 นครศรีธรรมราช

การประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี ทดสอบตัวอย่างทดสอบความชำนาญก่อนเปิดให้บริการที่เตรียมโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ผลการประเมินพบว่าถูกต้องร้อยละ 100 (ตารางที่ 2) จึงสามารถเปิดให้บริการการตรวจโรค COVID-19 ได้

ตารางที่ 1 ผลการทบทวนวิธีวิเคราะห์ด้วยตัวอย่าง Positive control nCoV 2019

Sample	ค่า Ct	ค่า Ct
	<i>RNase P</i> gene	<i>RdRp</i> gene
No template control	Undet.	Undet.
nCoV (1:1,000 dilution)	35.844	22.385
nCoV (1:100 dilution)	32.446	17.971
nCoV (1:10 dilution)	28.185	14.040
nCoV (no dilution)	24.769	10.689

Ct = Cycle threshold,

Undet. = Undetected

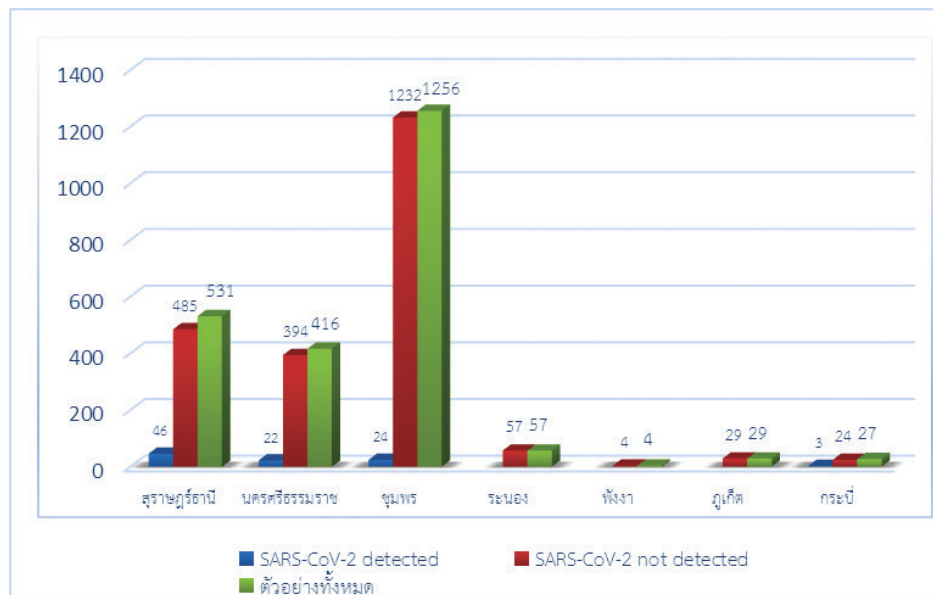
No Template control คือ ตัวควบคุมที่ไม่มี RNA เพื่อควบคุมการปนเปื้อน

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ โคโรนา 2019 (COVID-19) ด้วยวิธี real-time PCR ครั้งที่ 1/2563

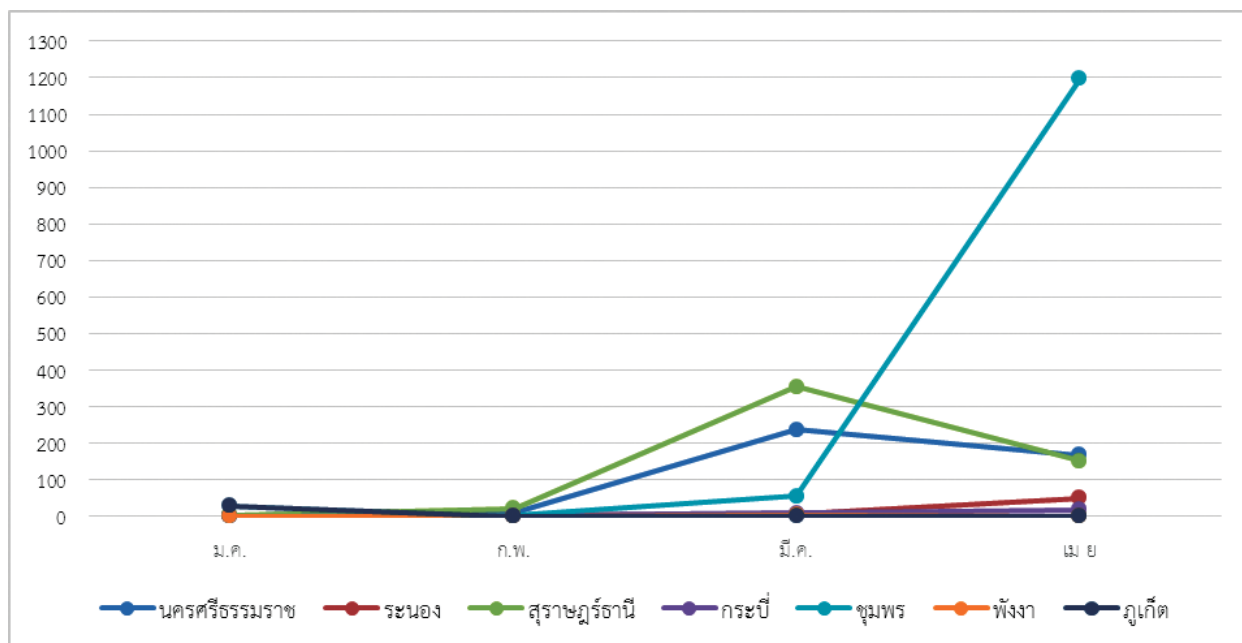
หมายเลขตัวอย่าง	ผลการตรวจวิเคราะห์	ผลการทดสอบ
หมายเลข nCoV-1/2020	ผลพบสารพันธุกรรม 2019- nCoV	ถูกต้องตามค่าเป้าหมาย
หมายเลข nCoV-2/2020	ผลไม่พบสารพันธุกรรม 2019- nCoV	ถูกต้องตามค่าเป้าหมาย
หมายเลข nCoV-3/2020	ผลไม่พบสารพันธุกรรม 2019- nCoV	ถูกต้องตามค่าเป้าหมาย
หมายเลข nCoV-4/2020	ผลไม่พบสารพันธุกรรม 2019- nCoV	ถูกต้องตามค่าเป้าหมาย
หมายเลข nCoV-5/2020	ผลไม่พบสารพันธุกรรม 2019- nCoV	ถูกต้องตามค่าเป้าหมาย

ผลการให้บริการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ตั้งแต่วันที่ 28 มกราคม ถึง 30 เมษายน พ.ศ. 2563 มีตัวอย่างส่งตรวจทั้งสิ้น 2,324 ตัวอย่าง พบผลบวก 95 ตัวอย่าง จาก 7 จังหวัดภาคใต้ตอนบน จังหวัดที่ส่งตรวจมากที่สุด คือ จังหวัดชุมพร ส่งตัวอย่างทั้งสิ้น 1,256 ตัวอย่าง พบผลบวก 24 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.9 รองลงมาคือ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ส่งตัวอย่างทั้งสิ้น 531 ตัวอย่าง พบผลบวก 46 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.7 จังหวัดนครศรีธรรมราช ส่งตัวอย่างทั้งสิ้น 416 ตัวอย่าง พบผลบวก 22 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.3 จังหวัดระนอง ส่งตัวอย่างทั้งสิ้น 57 ตัวอย่าง ไม่พบผลบวก จังหวัดภูเก็ต ส่งตัวอย่างทั้งสิ้น 29 ตัวอย่าง ไม่พบผลบวก จังหวัดกระบี่ ส่งตัวอย่างทั้งสิ้น 27 ตัวอย่าง พบผลบวก 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.1 และจังหวัดพังงา ส่งตัวอย่างทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง ไม่พบผลบวก ทั้งนี้จำนวนตัวอย่างในจังหวัดนครศรีธรรมราชเพิ่มมากขึ้นในเดือนมีนาคม คือ 237 ตัวอย่าง และลดลงในเดือนเมษายน คือ 167 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับจังหวัดสุราษฎร์ธานี คือเดือนมีนาคมมีจำนวน 354 ตัวอย่าง ในเดือนเมษายน 152 ตัวอย่าง

ในขณะที่จังหวัดชุมพรมีจำนวนตัวอย่างในเดือนมีนาคม 56 ตัวอย่าง ในเดือนเมษายนมีตัวอย่างเพิ่มขึ้นเป็น 1,198 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 1 และภาพที่ 2



ภาพที่ 1 ผลการให้บริการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ตั้งแต่วันที่ 28 มกราคม ถึง 30 เมษายน พ.ศ. 2563 แยกตามรายจังหวัด



ภาพที่ 2 จำนวนตัวอย่างส่งตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ตั้งแต่วันที่ 28 มกราคม ถึง 30 เมษายน พ.ศ. 2563 แยกตามรายเดือนของแต่ละจังหวัด

ศักยภาพการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ของโรงพยาบาลในเขตภาคใต้ตอนบน

นอกจากพัฒนาศักยภาพตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานีแล้ว ศูนย์ฯ ยังได้พัฒนาศักยภาพโรงพยาบาลในพื้นที่รับผิดชอบ 4 จังหวัดภาคใต้ตอนบน คือ จังหวัดชุมพร จังหวัดระนอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดนครศรีธรรมราช ตามนโยบายเชิงรุกของกระทรวงสาธารณสุข ในการจัดการการแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ได้กำหนดยุทธศาสตร์ “1 จังหวัด-1 แล็บ-100 ห้องปฏิบัติการ” เพื่อเร่งตรวจคัดกรองค้นหาผู้ป่วยโควิด-19 รายใหม่⁽⁸⁾ การดำเนินการตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ - เดือนเมษายน พ.ศ. 2563 มีโรงพยาบาลที่ได้รับการประเมินความพร้อมด้านทรัพยากรและผ่านการทดสอบความชำนาญ การตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พร้อมได้ขึ้นทะเบียน ตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทั้งหมด 6 แห่ง ใน 4 จังหวัด ผลการจัดตั้งห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลเครือข่าย รายละเอียดดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการจัดตั้งห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลเครือข่าย

ลำดับ	โรงพยาบาล	จังหวัด	วันที่ทดสอบตัวอย่าง ทดสอบความชำนาญ	ผลการประเมิน ตัวอย่างทดสอบ ความชำนาญ	ปริมาณตัวอย่าง ที่ตรวจได้/รอบ การตรวจวิเคราะห์
1	สุราษฎร์ธานี	สุราษฎร์ธานี	3 เมษายน 2563	ผ่าน 100%	94 ตัวอย่าง
2	มหาราชนครศรีธรรมราช	นครศรีธรรมราช	13 เมษายน 2563	ผ่าน 100%	46 ตัวอย่าง
3	ลิซล	นครศรีธรรมราช	13 เมษายน 2563	ผ่าน 100%	94 ตัวอย่าง
4	ทักษิณ (บริษัท สุราษฎร์ธานี เวชกิจ จำกัด)	สุราษฎร์ธานี	13 เมษายน 2563	ผ่าน 100%	94 ตัวอย่าง
5	ระนอง	ระนอง	29 เมษายน 2563	ผ่าน 100%	94 ตัวอย่าง
6	ชุมพรเขตรอุดมศักดิ์	ชุมพร	30 เมษายน 2563	ผ่าน 100%	94 ตัวอย่าง

วิจารณ์

จากสถานการณ์การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ซึ่งมีผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยเพิ่มขึ้นจำนวนมาก การเตรียมความพร้อมตั้งแต่ยังไม่มีการระบาดภายในประเทศเป็นสิ่งสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ในด้านการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเป็นปัจจัยหลักในการช่วยค้นหาผู้ป่วยรายใหม่ หากการตรวจวินิจฉัยหาผู้ป่วยรายใหม่ได้รวดเร็วจะส่งผลให้ดำเนินการควบคุมและป้องกันโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับบทความการเปลี่ยนผ่านจากมาตรการกึ่งล็อกดาวน์สู่การมีเสถียรภาพ โดยคำนวน อึ้งชูศักดิ์ และศุภมิตร ชุณหสวัณ⁽⁹⁾ ทั้งนี้ในปัจจุบัน การให้บริการห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลที่เป็นหลักสำคัญของประเทศคือ ห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ครอบคลุมทั่วประเทศ โดยได้ให้บริการในกรณีเกิดโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำของประเทศในหลายครั้ง เช่น การตรวจโรคไข้หวัดนก การตรวจโรคไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ H1(2009) การตรวจไวรัสโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (MERS-CoV)⁽¹⁰⁾ การเพิ่มเครือข่ายห้องปฏิบัติการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โรค COVID-19) เป็นการแก้ปัญหาที่ช่วยรองรับปริมาณตัวอย่างที่เพิ่มมากขึ้น โดยการขึ้นทะเบียนห้องปฏิบัติการเครือข่าย ตรวจ SARS-CoV-2 ซึ่งมีการกำหนดเกณฑ์ที่ต้องผ่านการประเมินผลการทดสอบความชำนาญและดำเนินการตามแนวทางการจัดตั้งห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โรค COVID-19)⁽¹¹⁾ โดยสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการสร้างเครือข่ายทางห้องปฏิบัติการระดับประเทศด้านอื่นๆ ต่อไป

สรุป

การพัฒนาศักยภาพทางห้องปฏิบัติการเพื่อรองรับการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานีและเครือข่ายนั้นมีความสำคัญ ส่งผลให้มีหน่วยบริการทางห้องปฏิบัติการที่สามารถให้บริการการตรวจที่ถูกต้องเชื่อถือได้ ทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของโรค COVID-19 สามารถดำเนินการได้โดยเร็ว และสามารถใช้เป็นตัวอย่างการสร้างเครือข่ายในการร่วมมือกับการระบาดของโรคอุบัติใหม่อื่น ๆ ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ และนางสาวสุนทรียา วัยเจริญ ฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการพัฒนาวีธีการตรวจวิเคราะห์โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ตลอดจนการให้คำแนะนำและสนับสนุนน้ำยาสำหรับการตรวจวิเคราะห์โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019

เอกสารอ้างอิง

1. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (novel coronavirus 2019, 2019-nCoV). [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 30 มี.ค. 2563]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/admin/article_files/1410_1.pdf.
2. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือเจ้าหน้าที่สาธารณสุขในการตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน กรณีการระบาดโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ในประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 30 เม.ย. 2563]; [138 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/viralpneumonia/file/g_other/G42_1.pdf.
3. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-2019) and the virus that causes it. [online]. 2020; [cited 2020 Apr 30]; [2 screens]. Available from: URL: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Factsheet for health professionals on coronaviruses, last updated 30 Jan 2020. [online]. 2020; [cited 2020 Apr 30]; [3 screens] Available from: URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/coronaviruses>.
5. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี. SOP 41 02 400 มาตรฐานการปฏิบัติงานเรื่อง การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2) โดยวิธี Real time RT-PCR. แก้ไขครั้งที่ A 01. สุราษฎร์ธานี: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี; 2563.
6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ประกาศห้องปฏิบัติการเครือข่ายตรวจ SARS-CoV-2. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 30 เม.ย. 2563]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www3.dmsc.moph.go.th/images/map_sars_cov_1010863.jpg.
7. ISO 15190:2003. Medical laboratories -- requirements for safety. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2003.
8. กองแผนงานและวิชาการ. รายงานการประชุมกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 2/2563. วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2563. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2563.

9. คำนวน อึ้งชูศักดิ์, ศุภมิตร ชุณหสัทธิวัฒน์. วิกฤติโควิด-19 ในประเทศไทย: การเปลี่ยนผ่านจากมาตรการ “กึ่งล็อกดาวน์” สู่การมี “เสถียรภาพ”. ว วิชาการสาธารณสุข 2563; 29(2): 377-80.
10. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. เครือข่ายห้องปฏิบัติการโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (EID-Lab Network). ใน: รายงานประจำปี 2558. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2558. หน้า 78-79.
11. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวทางการจัดตั้งห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์โรคโควิด-19 (COVID-19). [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 30 เม.ย. 2563]; [11 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www3.dmsc.moph.go.th/assets/post/RE1TY19QMDZfTEFCLTA3LTA0LTYz.pdf>.

Laboratory Capacity Building to Support the Pandemic of Coronavirus Disease 2019

**Phatthanan Thanaphatsiriyakul Thatsanee Masjamras Supaporn Seatan
and Jiraporn Phetrak**

Regional Medical Sciences Center 11 Surat Thani, Amphoe Muang, Surat Thani 84100, Thailand

ABSTRACT Owing to the outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Thailand, Clinical Pathology Laboratory of Regional Medical Sciences Center 11 Surat Thani (RMSc 11) had strengthened its capacities as well as its laboratory network for rapid and reliable diagnosis of COVID-19. For RMSc 11, there were 7 factors including facility and its environment, personnel, apparatus, chemicals and reagents, biosafety system, testing methods and reporting system to consider for strengthening. For the RMSc 11 laboratory network, each laboratory was required to perform self-assessment on its readiness and participated in a COVID-19 Proficiency Testing program. Our initiation revealed that the RMSc 11 laboratory has full capacities to diagnose COVID-19 infection. During January 28 to April 30, 2020, a total of 2,324 clinical samples were tested at RMSc 11 and 95 samples were positively reported. In addition, 6 laboratories within the RMSc laboratory network have been certified from Department of Medical Sciences for their capabilities to diagnose COVID-19 infection. All certified laboratories would be the network for investigation and monitoring of COVID-19 within the upper southern part of Thailand.

Keywords: COVID-19, laboratory capacity, laboratory network

การตรวจ SARS-CoV-2 ในกลุ่มแรงงานต่างด้าว จังหวัดสมุทรสาคร: ถอดบทเรียนการจัดการ เก็บน้ำลาย

ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์¹ สิริลดา สุพรรณคง¹ วิภาดา ขวัญแก้ว¹ สุคนธ์ทิพย์ ปุจฉาการ¹ ปานทิพย์ ศิริโชค¹
นุสรรา สัตย์เพริศพราย² และนวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา²

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอมือง สมุทรสงคราม 75000

²กองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้นำร่องโครงการตรวจหา SARS-CoV-2 เพื่อเฝ้าระวังเฉพาะกลุ่มในแรงงานต่างด้าว ช่วงเดือนพฤษภาคม 2563 และจังหวัดสมุทรสาครเป็นหนึ่งในเป้าหมายโครงการ จึงได้ลงพื้นที่ประสานงานและวางแผนก่อน เริ่มการเก็บตัวอย่าง การกำหนดจำนวนตัวอย่าง การอบรมให้ความรู้ การสาธิตขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำลาย การติดตามผล และการแจ้งพื้นที่รับทราบเพื่อปรับปรุงแก้ไข ผลการดำเนินการเก็บตัวอย่างน้ำลายจากแรงงานต่างด้าวจำนวน 2,168 ราย พบว่าตัวอย่างไม่ได้คุณภาพ 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างตรวจทั้งสิ้น 2,162 ราย พบว่าเป็นผลลบทั้งหมด การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ขั้นตอนการดำเนินงานเฝ้าระวังเชิงรุกในกลุ่มแรงงานต่างด้าวที่ควรปรับปรุง คือ ขั้นตอนการจัดเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ ทางห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ : SARS-CoV-2, แรงงานต่างด้าว, การตรวจเพื่อเฝ้าระวัง, ตัวอย่างน้ำลาย

Corresponding author E- mail: siriwan.c@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 7 August 2020

Accepted: 15 August 2020

บทนำ

จากการระบาดของโรคอุบัติใหม่ COVID-19 จากเชื้อ SARS-CoV-2 นั้น มีรายงานพบผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ส่วนใหญ่ไม่มีอาการ เชื้ออยู่ในระบบทางเดินหายใจ สารคัดหลั่งต่างๆ เลือด และอุจจาระ สามารถแพร่เชื้อได้ง่ายโดยติดต่อทั้งทางเดินหายใจ การกิน การสัมผัสผ่านเยื่อเมือกต่างๆ⁽¹⁾ การค้นหาผู้ติดเชื้อเพื่อกักกันจึงเป็นกุญแจสำคัญในการควบคุมการระบาดของโรค การตรวจหาเชื้อจากสารคัดหลั่งของระบบทางเดินหายใจส่วนบน และทางเดินหายใจส่วนล่างนั้นเป็นวิธีมาตรฐาน⁽²⁾ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสามารถตรวจได้จาก posterior oropharyngeal (deep throat) saliva^(3, 4) ทำให้สามารถเก็บตัวอย่างส่งตรวจได้ง่ายขึ้น และลดความเสี่ยงของบุคลากรสาธารณสุข การตรวจจาก deep throat saliva มีความไว และความจำเพาะร้อยละ 84.2 และ 98.9 ตามลำดับ⁽⁵⁾

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยกองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหาการติดเชื้อ COVID-19 จากตัวอย่างน้ำลายเดี่ยว และรวมตัวอย่าง (pool samples) ด้วยเทคนิค real time RT PCR ซึ่งได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีและจำนวน pool ที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้งาน^(6, 7) ให้มีความไวใกล้เคียงกับวิธีตรวจจากรายเดี่ยว⁽⁵⁾ เพื่อใช้ในการศึกษานำร่องการตรวจเฝ้าระวังเฉพาะกลุ่ม โดยดำเนินการในกลุ่มแรงงานต่างด้าวของเขตสุขภาพที่ 4 และ 5 ในเดือนพฤษภาคม 2563

จังหวัดสมุทรสาครเป็นพื้นที่ที่มีจำนวนแรงงานต่างด้าวมากกว่า 3 แสนคน นับได้ว่าหนาแน่นมากที่สุดในประเทศ แรงงานต่างด้าวเหล่านี้อาศัยอยู่รวมกัน โรงงานอุตสาหกรรม หอพัก และสถานประกอบการ ซึ่งอาจเสี่ยงต่อการระบาดของ COVID-19⁽⁸⁾ จึงเป็นพื้นที่เป้าหมายนำร่องในการสำรวจหาผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 เชิงรุก การศึกษานี้เป็นการเสนอวิธีดำเนินงานในพื้นที่จังหวัดสมุทรสาคร ข้อดีและสิ่งที่ต้องปรับปรุง เพื่อเป็นแนวทางในการขยายผลการดำเนินการค้นหาผู้ติดเชื้อเชิงรุกในพื้นที่อื่นของประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างและพื้นที่ศึกษา

เก็บตัวอย่าง deep throat saliva จากกลุ่มแรงงานต่างด้าวในจังหวัดสมุทรสาคร โดยเน้นกลุ่มแรงงานต่างด้าวที่มีการพักอาศัยและกระจายตัวเป็นชุมชนอย่างหนาแน่น โดยกลุ่มเป้าหมายกระจายอยู่ในเขตอำเภอเมืองสมุทรสาคร อำเภอกระทุ่มแบน และอำเภอบ้านแพ้ว จำนวน 1,500, 250 และ 150 ราย ตามลำดับ ทั้งนี้มีการจัดประชุมผู้เกี่ยวข้อง รวมถึงกลุ่มผู้นำชุมชนพื้นที่ที่เกี่ยวข้อง เพื่อวางแผนการเก็บตัวอย่าง กำหนดขนาดตัวอย่างในแต่ละอำเภอ และกำหนดจำนวนตัวอย่างเก็บรวมทุกพื้นที่ไม่มากกว่าวันละ 250 ตัวอย่าง โดยประสานเจ้าหน้าที่อาสาสมัครสาธารณสุขแรงงานต่างด้าว (อสต.) เพื่อให้ทราบจำนวนประชากรแรงงานต่างด้าว การประกอบอาชีพ ลักษณะที่พักอาศัย วางแผนช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง และก่อนการเก็บตัวอย่าง ออสต. อบรมให้ความรู้ สาดิษขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำลาย โดยใช้สื่อวีดิทัศน์คู่มือการเก็บตัวอย่างของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งมีทั้งภาษาไทย และภาษาต่างประเทศ 3 ภาษา คือ เมียนมา ลาว และกัมพูชา ซึ่งชุดเก็บตัวอย่างน้ำลายและน้ำยา VTM สำหรับการเก็บตัวอย่างได้รับการสนับสนุนจากกองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

กลุ่มเป้าหมายเก็บตัวอย่างตามคำแนะนำในช่วงเช้าก่อนการแปรงฟัน หรือการใช้น้ำยาบ้วนปาก หรือหลังจากการแปรงฟัน หรือการบ้วนปากไปแล้วเกิน 1 ชั่วโมงขึ้นไป และเจ้าหน้าที่ทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของตัวอย่าง หากไม่สมบูรณ์ให้กลุ่มเป้าหมายเก็บตัวอย่างน้ำลายใหม่ หากสมบูรณ์เจ้าหน้าที่พื้นแผ่นพาราฟิล์มทับและเก็บใส่ถุงพลาสติกซิปล็อค 3 ชั้น รวบรวมใส่กล่องควบคุมอุณหภูมิที่มีเจลรักษาความเย็นที่ 2-8 องศาเซลเซียส แล้วนำส่ง

กองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม ภายใน 24 ชั่วโมง พร้อมแบบนำส่งตัวอย่าง หรือเก็บรักษาที่ 2-8 องศาเซลเซียส แล้วนำส่งในวันต่อมา

การส่งรายงานผล

จากการตรวจวิเคราะห์หากพบผลบวกแจ้งกลับภายใน 3 ชั่วโมง สำหรับผลลบทำการรวบรวมรายงานผลส่งเมื่อสิ้นสุดโครงการ

ผล

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ได้ประชุมร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจังหวัดสมุทรสาคร (ภาพที่ 1) เพื่อวางแผนการดำเนินงานการเก็บตัวอย่างกลุ่มเป้าหมาย และผู้บริหารระดับสูงของกระทรวงสาธารณสุข ได้เข้าเยี่ยมชมพื้นที่ดำเนินงานด้วย (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ร่วมวางแผนการเก็บตัวอย่างกับจังหวัดสมุทรสาคร



ภาพที่ 2 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และอธิบดีกรมควบคุมโรค เข้าเยี่ยมชมพื้นที่เพื่อเตรียมความพร้อมในการนำร่องโครงการเฝ้าระวังผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 เชิงรุกในแรงงานต่างด้าว



ภาพที่ 3 ก



ภาพที่ 3 ข



ภาพที่ 3 ค

ภาพที่ 3 ก - 3 ค การลงพื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำลายของ รพ.กระทุ่มแบน และการเคหะทำเงิน จ.สมุทรสาคร

จากการเก็บตัวอย่างน้ำลายของพื้นที่ต่าง ๆ ในจังหวัดสมุทรสาคร (ภาพที่ 3 ก - 3 ค) ทั้งหมด 2,168 ราย และส่งตรวจ SARS-CoV-2 ที่กองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าตัวอย่างไม่ได้คุณภาพจำนวน 6 ตัวอย่าง เนื่องจากน้ำลายหกออกจากภาชนะบรรจุจากสาเหตุปิดฝาเกลียวไม่แน่น มีปัญหาในการบรรจุหีบห่อตัวอย่าง จึงมีตัวอย่างที่ได้รับการตรวจเพียง 2,162 ตัวอย่าง ผลการตรวจเฝ้าระวังได้ผลลบทั้งหมด รายงานฉบับสมบูรณ์ได้จัดส่งเป็นเอกสารอิเล็กทรอนิกส์ หลังจากการแจ้งผลเบื้องต้นแล้ว 1 เดือน

การดำเนินการเฝ้าระวังเชิงรุกของจังหวัดสมุทรสาคร พบข้อบกพร่องในกระบวนการ กล่าวคือการจัดเรียงตัวอย่างก่อนการรับเข้าระบบ และการจัดทำใบสรุปการเรียงลำดับตัวอย่างให้ก่อนส่งห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการใช้เวลานาน

วิจารณ์

โครงการตรวจเฝ้าระวังเชิงรุกในการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ในน้ำลายจากแรงงานต่างด้าวครั้งนี้เป็นการดำเนินการเป็นครั้งแรก ทำให้ยังอาจพบปัญหาในบางขั้นตอน จึงได้นำมาถอดบทเรียนในครั้งนี้ ปัญหาที่พบ ได้แก่ ปัญหาตัวอย่างไม่ได้คุณภาพที่เกิดจากภาชนะปิดไม่แน่น เป็นจุดที่ต้องปรับปรุงในขั้นตอนการตรวจสอบตัวอย่างที่เป็นขั้นตอนสุดท้ายของเจ้าหน้าที่ก่อนการพันแผ่นพาราฟิล์มและใส่ลงถุงซิปล็อค ในการดำเนินการแบบกลุ่มใหญ่ครั้งนี้ยังขาดการตกลงในรายละเอียดการรวบรวมตัวอย่างตั้งแต่ต้นทางให้มีการเขียนเลขลำดับตัวอย่างบนถุง ให้ตรงกับเลขลำดับที่ระบุในเอกสารสรุป ซึ่งประกอบด้วยเลขลำดับตัวอย่าง ชื่อ-สกุลหรือรหัสตัวอย่าง การเขียนเลขลำดับตัวอย่างบนถุงให้ตรงกับที่ระบุในเอกสารสรุป ซึ่งหากมีการตกลงรายละเอียดให้ดำเนินการตั้งแต่ต้นทางจะช่วยให้งานและเวลาของห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบตัวอย่าง และเรียงลำดับให้ตรงกับเอกสารก่อนการรับส่งตรวจเข้าระบบการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังขาดการขอรายชื่อที่พิมพ์เป็นเอกสารอิเล็กทรอนิกส์จากพื้นที่ เพื่อช่วยให้งานลดภาระการพิมพ์ใบรายงานผลของห้องปฏิบัติการ และลดความผิดพลาดที่อาจเกิดจากการอ่านและพิมพ์ใหม่ได้^(9, 10) ซึ่งอาจช่วยลดระยะเวลาการออกรายงานผลลง และลดค่าใช้จ่ายในการจ้างเจ้าหน้าที่บันทึกข้อมูล

การประชาสัมพันธ์ในพื้นที่ถึงวิธีและแนวทางปฏิบัติในการเก็บน้ำลายให้กลุ่มตัวอย่างรับทราบก่อนลงพื้นที่จริงอย่างน้อย 1 วัน เพื่อให้กลุ่มตัวอย่างเตรียมตัวมีความสำคัญ มีการอธิบายวิธีเก็บตัวอย่างที่ชัดเจนในทุกขั้นตอนให้แรงงานต่างด้าวทราบ ซึ่งอาจต้องจัดทำเป็นเอกสารสื่อสารให้ครอบคลุมทุกภาษาที่มีแรงงานต่างชาติ โดยทำงานร่วมกับเจ้าหน้าที่ อสต. เพื่อการสื่อสารที่ชัดเจนยิ่งขึ้น ต้องวางแผนช่วงเวลาลงพื้นที่เก็บตัวอย่างให้ชัดเจน รัดกุม เพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างครบตามที่กำหนด เน้นย้ำผู้ปฏิบัติงานในขั้นตอนที่อาจทำให้เกิดความผิดพลาดหรือข้อควรระวังต่าง ๆ

เช่น ไม่ควรแปรงฟัน ใช้น้ำยาบ้วนปาก ดื่มน้ำ ทานอาหาร หรือเคี้ยวหมากฝรั่ง ก่อนเก็บน้ำลายควรเก็บน้ำลายด้วยวิธี “ขาก” เพื่อให้ได้น้ำลายที่อยู่ในลำคอส่วนลึก (deep throat saliva)

จุดเด่นของจังหวัดสมุทรสาคร คือ มีเครือข่ายการทำงานที่เข้มแข็ง ผู้ปฏิบัติงานทำงานเชิงรุกกับเครือข่ายอย่างต่อเนื่อง มีข้อมูลจำนวนประชากรแรงงานต่างด้าวในพื้นที่ค่อนข้างละเอียดในทุกมิติ การมีส่วนร่วมของเจ้าหน้าที่อาสาสมัครสาธารณสุขแรงงานต่างด้าว (อสต.) ช่วยในการประสานงาน สื่อสารและอธิบายขั้นตอนการเก็บตัวอย่างให้กลุ่มแรงงานต่างด้าวเข้าใจได้ง่าย การมีข้อมูลชุมชนแรงงานต่างด้าวที่ชัดเจนกระจายในพื้นที่ต่าง ๆ ช่วยให้เจ้าหน้าที่สามารถเข้าไปเก็บตัวอย่างได้ง่าย การผลิตสื่อวีดิทัศน์วิธีการเก็บตัวอย่างด้วยภาษาที่กลุ่มเป้าหมายเข้าใจง่ายของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ช่วยให้การเก็บตัวอย่างสามารถดำเนินการได้อย่างราบรื่น อีกทั้งกลยุทธ์ที่จังหวัดสมุทรสาครใช้ในการเชิญชวนกลุ่มเป้าหมายแรงงานต่างด้าว คือ การแจกหน้ากากอนามัย แอลกอฮอล์เจล และ face shield และให้ความรู้ในการปฏิบัติตนเพื่อป้องกันโรค COVID-19

ผลการตรวจซึ่งได้ผลลบทั้งหมด เป็นข้อมูลที่ช่วยให้ประเทศไทยมั่นใจได้ว่าจะสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของ COVID-19 ในกลุ่มแรงงานต่างด้าวของจังหวัดสมุทรสาครได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการเฝ้าระวังครั้งนี้เป็นการดำเนินงานในกลุ่มเล็กเมื่อเทียบกับแรงงานต่างด้าวที่มีทั้งหมดในจังหวัดสมุทรสาคร ความผิดพลาดที่ได้จากการดำเนินการครั้งนี้จึงสามารถนำไปใช้เป็นบทเรียนสำหรับการขยายพื้นที่การเฝ้าระวังเพิ่มเติมในกลุ่มแรงงานต่างด้าวต่อไป

สรุป

การตรวจคัดกรองโรค COVID-19 ไม่พบผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ในแรงงานต่างด้าวจากโครงการนำร่องการตรวจเฝ้าระวังครั้งนี้ ผลการถอดบทเรียนพบความผิดพลาดที่นำไปใช้เป็นบทเรียนในการปรับปรุงแก้ไขวิธีการบริหารจัดการการตรวจเฝ้าระวังในแรงงานต่างด้าว ก่อนการส่งตัวอย่างเข้าสู่การตรวจของห้องปฏิบัติการต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสมุทรสาคร โรงพยาบาลสมุทรสาคร โรงพยาบาลกระทุ่มแบน โรงพยาบาลบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร เจ้าหน้าที่อาสาสมัครสาธารณสุขแรงงานต่างด้าวจังหวัดสมุทรสาคร และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินการทุกท่าน ที่สนับสนุนการศึกษานำร่องนี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Transmission of Sars-CoV-2: implications for infection prevention precautions. [online]. 2020; [cited 31 Jul 2020]; [20 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>.
2. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. [online]. 2020; [cited 31 Jul 2020]; [7 screens]. Available from: URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331501/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng.pdf>.

3. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* [serial online]. 2020; [cited 31 Jul 2020]; 20(5): [27 screens]. Available from: URL: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30196-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30196-1/fulltext).
4. Xu R, Cui B, Duan X, Zhang P, Zhou X, Yuan Q. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *Int J Oral Sci.* [serial online]. 2020; [cited 31 Jul 2020]; 12: [6 screens]. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/s41368-020-0080-z.pdf>.
5. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K, Janchompoo P, Wongtabtim G, Suksuwan W, et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect.* [serial online]. 2020; [cited 31 Jul 2020]; [4 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7227531/pdf/main.pdf>.
6. Lohse S, Pfuhl T, Berkó-Göttel B, Rissland J, Geißler T, Gärtner B, et al. Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people. *Lancet Infect Dis.* [serial online]. 2020; [cited 7 Aug 2020]; [2 screens]. Available from: URL: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30362-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30362-5/fulltext).
7. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Coronavirus (COVID-19) update: FDA issues first emergency authorization for sample pooling in diagnostic testing. [online]. 2020; [cited 7 Aug 2020]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-issues-first-emergency-authorization-sample-pooling-diagnostic>.
8. Kucharski AJ, Klepac P, Conlan AJK, Kissler SM, Tang ML, Fry H, et al. Effectiveness of isolation, testing, contact tracing, and physical distancing on reducing transmission of SARS-CoV-2 in different settings: a mathematical modelling study. *Lancet Infect Dis.* [serial online]. 2020; [cited 31 Jul 2020]; [10 screens]. Available from: URL: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30457-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30457-6/fulltext).
9. Lippi G, von Meyer A, Cadamuro J, Simundic AM. PREDICT: a checklist for preventing preanalytical diagnostic errors in clinical trials. *Clin Chem Lab Med* 2020; 58(4): 518-26.
10. Plebani M. Diagnostic errors and laboratory medicine-causes and strategies. *EJIFCC* 2015; 26(1): 7-14.

Detection of SARS-CoV-2 in Foreign Workers at Samut Sakhon Province: Lessons Learned from Saliva Samples Collection

Siriwan Chaisomboonpan¹ Sirilada Suphankong¹ Wiphada Khwankaew¹
Sukontip Putcharkarn¹ Pantip Sirichote¹ Nusara Satproedprai²
and Nuanjun Wichukchinda²

¹Regional Medical Sciences Center 5 Samut Songkhram, Department of Medical Sciences, Amphoe Maung, Samut Songkram, 75000

²Division of Genomic Medicine and Innovation Support, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Department of Medical Sciences conducted a pilot study on a sentinel surveillance for SARS-CoV-2 in deep throat saliva collected from a foreign worker group in May 2020. Samut Sakhon, one of the provinces with the highest number of foreign workers in Thailand, was a site for the study. We organized meetings with all stakeholders within the province on project planning, areas for samples collection, training and demonstration on how to collect deep throat saliva, monitoring and reporting results of the project. A total of 2,168 saliva samples were collected from foreign workers. Six of them were excluded from the study due to unqualified samples. The rest of saliva samples showed negative results. Our study indicated that improvement on pre-analytical management of specimens is essential for future sentinel surveillances of the foreign worker group.

Keywords : SARS-CoV-2, foreign workers, Sentinel surveillance, saliva samples

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุxonามัยสำหรับมือด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

เมเนกา วีน และวงเดือน นาคินิม

สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ จากสถานการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่ยังมีการแพร่ระบาดทั่วโลก การล้างมือด้วยผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบโดยไม่ใช้น้ำจึงได้รับความนิยม จากประกาศกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54ง พ.ศ. 2563 กำหนดว่าเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เพื่อสุxonามัยสำหรับมือโดยไม่ใช้น้ำมีความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์ ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ หรือ เอ็น-โพรพิลแอลกอฮอล์ เพียงสารเดียวหรือผสมรวมกันต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 โดยปริมาตร การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิดได้พร้อมกันด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีและตัวตรวจวัดชนิด FID โดยใช้คอลัมน์ DB-624 โปรแกรมอุณหภูมิในช่วง 40-150 °C ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่ามีค่าความจำเพาะ การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0-5.0 มก./มล. มีค่า $r > 0.9999$ ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 99.0-103.0 ความเที่ยงจากการทำซ้ำในวันเดียวกัน ระหว่างวันและระหว่างนักวิเคราะห์มีค่าที่ยอมรับได้ ($RSD < 3\%$) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 1.81, 1.76 และ 1.80 %v/v ตามลำดับ ขีดจำกัดของการตรวจพบ 0.18 %v/v และค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ 0.05 %v/v ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนานี้มีความเหมาะสมและนำไปวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้

คำสำคัญ: การทดสอบความถูกต้องของวิธี, ปริมาณแอลกอฮอล์, ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุxonามัยสำหรับมือ, แก๊สโครมาโทกราฟี

Corresponding author E-mail: menaka.v@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 19 August 2020

Accepted: 11 September 2020

บทนำ

เนื่องจากในปัจจุบันที่ยังคงมีสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้มีการรณรงค์ให้ความรู้แก่ประชาชนในการดูแลป้องกันตนเองจากโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) โดยการใส่หน้ากากอนามัย หลีกเลี่ยงการอยู่สถานที่แออัด ไม่อยู่ใกล้ชิดกับผู้ป่วยที่มีอาการไอ จาม และหมั่นล้างมือบ่อยๆ ซึ่งการทำความสะอาดมือด้วยผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบในรูปแบบสารละลายและเจลโดยไม่ใช้น้ำ เป็นวิธีหนึ่งที่มีความนิยมนิยมมากสำหรับการป้องกันตนเองของประชาชนในประเทศไทย โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการจำหน่ายในท้องตลาดอย่างแพร่หลาย จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54ง พ.ศ. 2563⁽¹⁾ กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำความสะอาดมือโดยไม่ใช้น้ำ จัดเป็นเครื่องสำอาง และกำหนดให้เครื่องสำอางดังกล่าวมีความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล (ethyl alcohol หรือ ethanol) ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ หรือไอโซโพรพานอล (isopropyl alcohol หรือ isopropanol) เอ็น-โพรพิลแอลกอฮอล์ หรือ เอ็น-โพรพานอล (n-propyl alcohol หรือ n-propanol) เพียงสารเดียวหรือผสมรวมกันต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 โดยปริมาตร การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาและการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ โดยสามารถเตรียมตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย สามารถวิเคราะห์สารกลุ่มแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด ได้พร้อมกัน โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ การทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) เพื่อยืนยันว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้องเหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบให้เป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐาน และมีประสิทธิภาพตามวัตถุประสงค์

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าพิคก 0.1–0.01 มิลลิกรัม

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) (Agilent 6890 series) ประกอบด้วย detector ชนิด Flame ionization detector (FID) ระบบฉีดสารอัตโนมัติ โดยใช้คอลัมน์ DB-624 ขนาด 0.53 mm I.D. × 30 m length × 3 µm film thickness

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี methyl alcohol ชนิด analytical reagent grade

สารมาตรฐาน สาร ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol (Chem Service) ความบริสุทธิ์ >99% ใช้เป็นสารมาตรฐาน และสาร 1,4-dioxane (Merck®) ความบริสุทธิ์ >99% เป็นสารมาตรฐาน ชนิด internal standard

ตัวอย่าง

1. ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์ส่วนประกอบรูปแบบเจลที่เตรียมขึ้นเองโดยปราศจากแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด เป็นส่วนประกอบ โดยมีส่วนผสมของน้ำ, carbopol, triethanolamine และน้ำหอม เป็นส่วนประกอบ สำหรับใช้เป็น Matrix blank เพื่อใช้ในการตรวจสอบ parameter ของการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

วิเคราะห์ เช่น ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and working range) และความแม่นยำ (accuracy)

2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลจำนวน 3 ตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol และมีการวางจำหน่ายในท้องตลาด เพื่อใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีเฉพาะ parameter ความเที่ยง (precision)

3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลจำนวน 170 ตัวอย่างที่ส่งตรวจโดยหน่วยงานรัฐและผู้ประกอบการ ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงมิถุนายน 2563

วิธีการทดสอบ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Stock standard solution และ Standard solution

สารละลายมาตรฐาน Stock standard solution เตรียมโดยชั่งสาร ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol แต่ละชนิดจำนวน 0.5 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐาน (stock standard solution) ของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน Standard solution เตรียมโดยปิเปต stock standard solution แต่ละชนิดจำนวน 5.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐาน (standard solution) ของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน Internal standard solution เตรียมโดยชั่งสาร 1,4-dioxane จำนวน 1.5 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม methyl alcohol เขย่าให้ละลายและปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จนครบปริมาตร จะได้ internal standard solution ที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลประมาณ 0.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าพิกัด 0.1–0.01 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จากนั้น ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จนครบปริมาตร เก็บในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องมือต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด ด้วยเครื่อง GC-FID Detector ใช้สภาวะโปรแกรม อุณหภูมิ Column Oven 40°C ถึง 150°C, Injection port temperature 250°C, Detector temperature 250°C อัตราการไหล 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรการฉีด 1 ไมโครลิตร

เมื่อสภาวะของเครื่อง GC พร้อมใช้งาน ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ คำนวณ %RSD ของ peak area ratio, retention time (RT), Theoretical Plate count และค่า tailing factor โดยเกณฑ์ยอมรับค่าการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ ดังนี้ %RSD (peak area ratio) $\leq 3\%$, %RSD (RT) $\leq 3\%$, Theoretical Plate count (EP), $N > 20,000$ และ tailing factor 0.8–1.2

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)⁽²⁾**การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)**

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเข้าเครื่อง GC แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) โดยค่า r ที่ยอมรับได้ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane (internal standard solution) ที่มีความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC ภายใต้สภาวะที่กำหนด เพื่อตรวจสอบการแยกของสารทั้ง 4 ชนิด จากการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง และต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงในตัวอย่าง วิเคราะห์ 7 ซ้ำ โดยค่า LOD เท่ากับความเข้มข้นของสารที่สนใจ ที่มี signal-to-noise ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 3 คำนวณเป็นร้อยละโดยปริมาตรของตัวอย่าง

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นใกล้เคียงค่าต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน และเติม internal standard solution ที่มีความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน matrix blank วิเคราะห์จำนวน 7 ซ้ำ แล้วคำนวณเป็นร้อยละโดยปริมาตรของ %Recovery และ %Relative Standard Deviation (%RSD) โดยเกณฑ์ยอมรับร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ต้องอยู่ในช่วง 95.0–110.0% และค่า %RSD $\leq 3\%$

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง Matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง เพื่อคำนวณหาปริมาณสารมาตรฐานที่ตรวจพบ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือ r) ซึ่งค่า r ที่ยอมรับได้ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision)**ความแม่นยำ (Accuracy)**

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง Matrix blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol ให้มีความเข้มข้น 19, 39 และ 49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ คำนวณปริมาณแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเป็นร้อยละโดยปริมาตร แล้วคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยเกณฑ์ยอมรับร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ต้องอยู่ในช่วง 95.0–110.0 และค่า %RSD $\leq 3\%$

ความเที่ยง (Precision)

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง วิเคราะห์ตัวอย่างละ 7 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างเป็นร้อยละโดยปริมาตร คำนวณค่า %RSD โดยเกณฑ์ยอมรับได้ของค่า %RSD ≤ 3%

การวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน (Intermediate precision, between-day)

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง เป็นเวลา 5 วัน วันละ 7 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างเป็นร้อยละโดยปริมาตร คำนวณค่า %RSD โดยเกณฑ์ยอมรับได้ของค่า %RSD ≤ 3%

การวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ (Intermediate precision, between-analysts)

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง โดยนักวิเคราะห์ 3 คน คนละ 7 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างเป็นร้อยละโดยปริมาตร ประเมินความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง โดยนักวิเคราะห์ทั้ง 3 คน คำนวณค่า %RSD โดยเกณฑ์ยอมรับได้ของค่า %RSD ≤ 3%

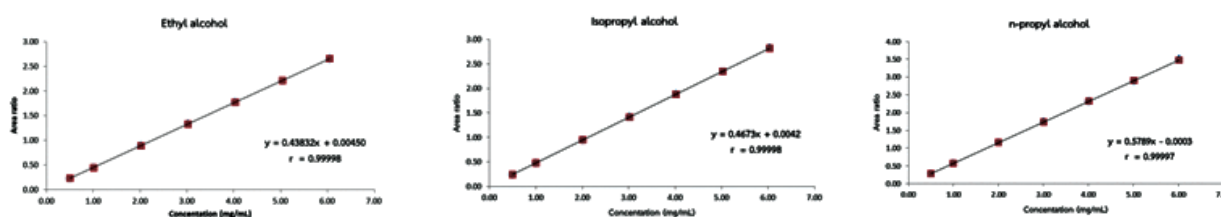
การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Measurement uncertainty)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽³⁾ โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่งรวมของค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ ปริมาณสารที่พบหน่วยเป็นร้อยละโดยปริมาตร (%v/v) โดยคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจากกราฟมาตรฐานโดยใช้สมการเส้นตรง⁽⁴⁾

ผล

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

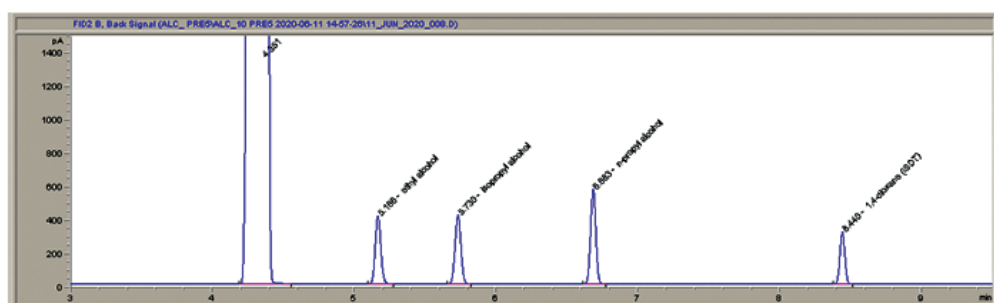
กราฟมาตรฐานของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่ช่วงความเข้มข้น 0.5–6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99998, 0.99998 และ 0.99997 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1



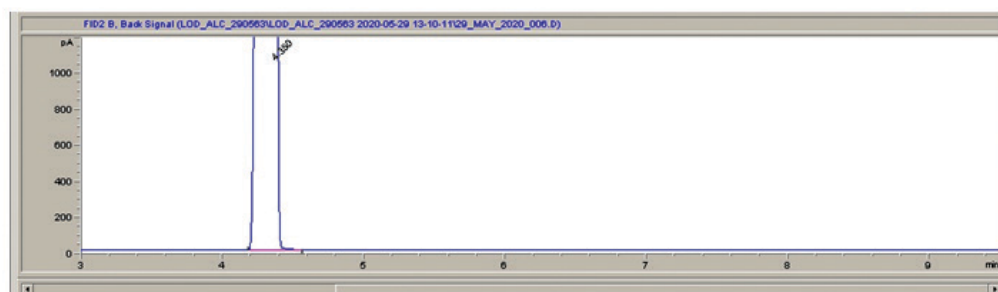
ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

เมื่อนำสารละลายมาตรฐาน ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane (internal standard solution) ภายใต้อุณหภูมิของเครื่อง GC พบว่าสามารถแยกพีคของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane ออกจากกันได้ โดยมีค่า retention time ประมาณ 5.1, 5.7, 6.6 และ 8.4 นาที ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล (Matrix blank) และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol พบว่าไม่มีพีคของสารอื่นในตัวอย่างรบกวน ดังแสดงในภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane (internal standard)



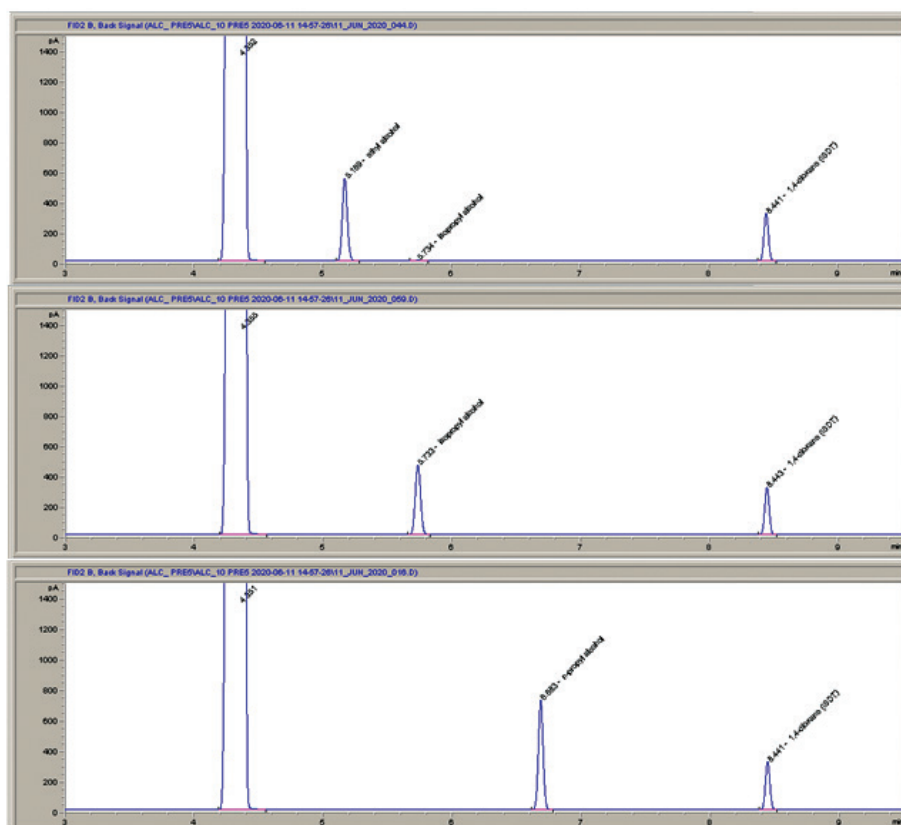
ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ Matrix blank

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

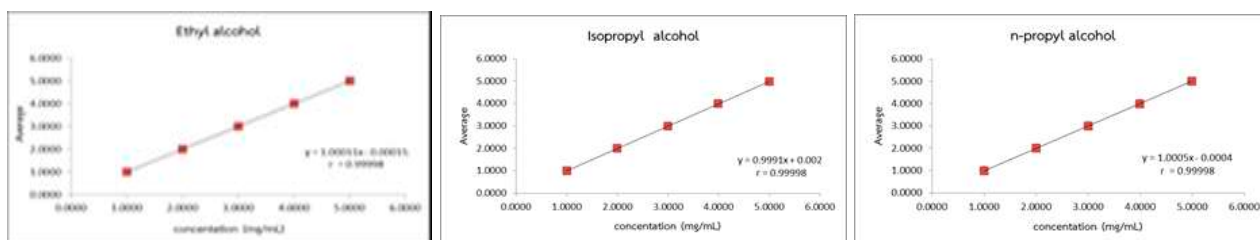
กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมกับพื้นที่ใต้พีคมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยคำนวณหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฉลี่ยที่ตรวจวิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99998, 0.99998 และ 0.99998 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)^(2, 5)

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง Matrix blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol ให้มีความเข้มข้น 19, 39 และ 49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ พบว่าค่า %Recovery อยู่ในช่วง 99.45-102.79 และค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.26-0.61 ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane (internal standard)



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range) ของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol

ตารางที่ 1 ค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) ของวิธีวิเคราะห์

Alcohol Additives	Alcohol Additives 35 %v/v (n = 7*)		Alcohol Additives 70 %v/v (n = 7*)		Alcohol Additives 90 %v/v (n = 7*)	
	%Recovery	%RSD	%Recovery	%RSD	%Recovery	%RSD
Ethyl alcohol	99.92-100.58	0.26	99.72-101.36	0.56	100.99-102.78	0.58
Isopropyl alcohol	99.70-100.73	0.54	100.32-101.73	0.61	101.07-102.79	0.41
n-Propyl alcohol	99.45-101.10	0.60	101.65-102.25	0.58	101.50-102.36	0.50

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การทดสอบความเที่ยง (Precision)**การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)**

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่างจำนวน 7 ขั้ว พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 0.86, 1.56 และ 1.48 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 2

การวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน (Intermediate precision, between-day)

จากวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง เป็นเวลา 5 วัน วันละ 7 ขั้ว พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 0.76, 0.91 และ 0.96 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยง โดยการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกันและการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน

Alcohol	วันที่	ปริมาณ (%v/v) (n = 5*)		%RSD	
		ค่าเฉลี่ย	%RSD	ค่าเฉลี่ยระหว่างวัน	ค่าเฉลี่ยระหว่างวัน
Ethyl alcohol	1	75.5573	0.42	74.8817	0.76
	2	74.8043	0.37		
	3	74.5616	0.86		
	4	74.9010	0.68		
	5	74.5844	0.55		
Isopropyl alcohol	1	66.0337	0.37	65.9172	0.91
	2	65.3287	0.39		
	3	66.0424	1.56		
	4	66.1736	0.61		
	5	66.0076	0.42		
n-Propyl alcohol	1	64.2040	1.48	64.1612	0.96
	2	64.0352	0.70		
	3	63.7629	0.58		
	4	64.7664	0.40		
	5	64.0373	0.51		

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ซ้ำโดยต่างนักวิเคราะห์ (Intermediate precision, between-analysts)

จากวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง โดยนักวิเคราะห์ 3 คน คนละ 7 ขั้ว พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 1.09, 1.10 และ 1.00 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ซ้ำโดยต่างนักวิเคราะห์

Alcohol	นักวิเคราะห์ที่	ปริมาณ (%v/v)		
		ค่าเฉลี่ย (n = 7*)	ค่าเฉลี่ยนักวิเคราะห์ (n = 3)	%RSD
Ethyl alcohol	1	74.8043	76.1821	1.09
	2	75.9679		
	3	77.7741		
Isopropyl alcohol	1	65.3287	65.2924	1.10
	2	65.2197		
	3	65.3287		
n-Propyl alcohol	1	63.7685	63.9795	1.00
	2	63.4813		
	3	64.6888		

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

จากผลการวิเคราะห์พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับร้อยละ 0.18 โดยปริมาตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้เท่ากับร้อยละ 1.81, 1.76 และ 1.80 โดยปริมาตร ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ในช่วง 98.09–100.95, 98.50–101.64 และ 98.99–102.11 ตามลำดับ และ %RSD เท่ากับ 1.23, 1.33 และ 1.43 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4

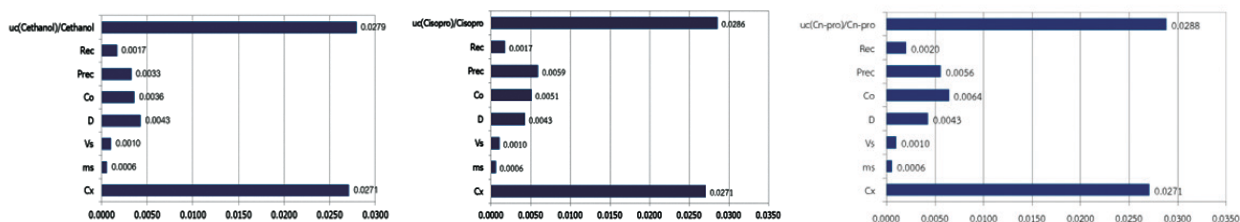
ตารางที่ 4 ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของค่า LOQ

Alcohol Additives	LOQ (n = 7*)	
	%Recovery	%RSD
Ethyl alcohol	98.09–100.95	1.23
Isopropyl alcohol	98.50–101.64	1.33
n-Propyl alcohol	98.99–102.11	1.43

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

จากการประเมินประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด พบว่าแหล่งของค่าความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ได้แก่ สารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง การทำซ้ำ (repeatability) กราฟมาตรฐาน (calibration curve) และค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ได้ค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า k = 2 เท่ากับ ร้อยละ 0.05, 0.05 และ 0.05 โดยปริมาตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ตามลำดับ

วิจารณ์

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุxonามัยสำหรับมือครั้งนี้ ได้ดัดแปลงจากการวิเคราะห์ ILIADe143:2019⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ ethyl alcohol ในผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่มีลักษณะตัวอย่างแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุxonามัยสำหรับมือรูปแบบเจล และมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์แอลกอฮอล์ที่อนุญาตให้ใช้ได้พร้อมกัน 3 ชนิด ในเวลาเดียวกัน จึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการใช้เครื่อง GC จากเดิมวิธี ILIADe143:2019 ซึ่งเป็นแบบ gradient ใช้คอลัมน์ DB-624 ใช้สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ Column Oven 45 °C ถึง 200 °C, Injection temperature 230 °C, Detector temperature 230 °C และ split approx. 120 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นการใช้อย่างได้สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ Column Oven 40 °C ถึง 150 °C, Injection temperature 250 °C, Detector temperature 250 °C และ split approx. 50 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้เครื่อง GC เป็นแบบ gradient ใช้คอลัมน์ DB-624 และ Flame Ionization Detector (FID) เป็นตัวตรวจวัด เช่นเดียวกับในวิธี ILIADe143:2019 ซึ่งพบว่าภายใต้สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้ครั้งนี้สามารถแยก ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane ออกจากกันได้ รวดเร็วและประหยัดเวลายิ่งขึ้น

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับได้ คือการทดสอบความเหมาะสมของระบบได้ค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของค่า Retention time $\leq 3\%$, %RSD ของค่า peak area ratio $\leq 3\%$, ค่าสูงสุดของ tailing factor < 1.2 , ค่าต่ำสุดของ Theoretical Plate count $> 50,000$ และค่าต่ำสุดของ resolution > 5 การทดสอบความจำเพาะของวิธี พบว่าภายใต้สภาวะของเครื่อง GC การตรวจวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุxonามัยสำหรับมือ ไม่พบพิกัดที่ตรงกับสารมาตรฐาน การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.5–6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99998, 0.99998 และ 0.99997 ตามลำดับ การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวิเคราะห์ (Working range) ในช่วงของความเข้มข้น 1.0–5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า r เท่ากับ 0.99998 ของแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด การทดสอบค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) และความเที่ยง (Precision) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุxonามัยสำหรับมือรูปแบบเจล ที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับคือ %RSD ไม่เกิน 3% และค่าร้อยละของการคืนกลับของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol อยู่ในช่วงระหว่าง 99.0–103.0%

วิธีวิเคราะห์ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุxonามัยสำหรับมือ มีการควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจวิเคราะห์ (Internal Quality

control) โดยกำหนดให้กราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ≥ 0.9995 ค่า %recovery อยู่ในช่วงระหว่าง 95.0–110.0 ทุกการวิเคราะห์ และเมื่อวิเคราะห์ duplicate sample ต้องมีค่า %RPD ไม่เกิน 3% ผลการวิเคราะห์มีหน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก แล้วนำค่าความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ของผลิตภัณฑ์มาใช้ในการคำนวณแปลงหน่วยเป็นร้อยละโดยปริมาตร ในการรายงานผลการทดสอบตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54ง พ.ศ. 2563 กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ (alcohol based hand sanitizer) เป็นเครื่องสำอาง และกำหนดให้ปริมาณของแอลกอฮอล์ชนิดเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol หรือ ethanol) ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol หรือ isopropanol) หรือ เอ็น-โพรพิลแอลกอฮอล์ (เอ็น-โพรพานอล) (n-propyl alcohol หรือ n-propanol) เพียงชนิดเดียวหรือผสมรวมกันต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 โดยปริมาตร (volume by volume) เพื่อให้สามารถนำผลวิเคราะห์ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพตามกฎหมายต่อไป

จากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ในประเทศไทย ทำให้มีหน่วยงานราชการและผู้ประกอบการส่งตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือจำนวน 170 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงมิถุนายน 2563 พบว่าชนิดและปริมาณแอลกอฮอล์เป็นไปตามที่กฎหมายกำหนดจำนวน 94 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55.3 และมีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่าที่กฎหมายกำหนดจำนวน 76 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 44.7 แสดงว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่มีการวางจำหน่ายในท้องตลาดให้แก่ผู้บริโภค ยังมีคุณภาพและปริมาณของแอลกอฮอล์ไม่เป็นไปตามที่กฎหมายกำหนด จนอาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังต่อไปเพื่อติดตามคุณภาพของผลิตภัณฑ์หลังจำหน่ายให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อสุขภาพและอนามัยของประชาชน

สรุป

การพัฒนาและการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ มีความถูกต้อง แม่นยำ ความไวและความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบเหมาะสมกับการใช้งาน (fitness for intended use) และให้ผลทุกพารามิเตอร์ผ่านเกณฑ์การยอมรับ เพื่อให้ผลการวิเคราะห์เป็นไปอย่างถูกต้องและเชื่อถือได้ โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลเป็นตัวแทนสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยตามกฎหมาย เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2558 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เพื่อสุขอนามัยสำหรับมือที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54 ง (วันที่ 9 มีนาคม 2563). หน้า 6.
2. ทิพวรรณ นิงน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
3. EURACHEM/CITAC. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. [online]. 2000; [cited 2020 Jun 15]; [126 screens]. Available from: URL: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2000-1.pdf>.
4. สุวรรณ จารุณ และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
5. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical method: a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. [online]. 2014; [cited 2020 Jun 15]; [70 screens]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.
6. Customs Laboratories European Network. ILIADe 143:2019 CLEN Method. Determination of ethanol in alcoholic products by GC-FID version 14, October 2019. [online]. 2019; [cited 2020 Jun 15]; [7 screens]. Available from: URL: https://ec.europa.eu/taxation_customs/sites/taxation/files/iliade-143_ethanol_gc-fid.pdf.

Method Validation of Alcohol Contents in Alcohol-based Hand Sanitizer Products Using Gas-chromatography

Menaka Vivon and Wongduan Nakniyom

Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Science, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Since the situation of COVID-19 infection around the world has still been widespread. Therefore, the alcohol-based sanitizer products are used popularly for washing hand without water. In Thailand, according to the Notification No. 137, Special Part 54, (2020) of the Ministry of Public Health, only ethyl alcohol, isopropyl alcohol or n-popyl alcohol are used in alcohol based hand sanitizer products which its total content shall not be less than 70% v/v. This study was aimed to develop and validate the method to determine three types of alcohol simultaneously using Gas-chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID). The test conditions were composed of DB-624 column with oven temperature program from 40-150 °C. The method was specific. The linearity and working range were shown between 1.0-5.0 mg/mL with $r > 0.9999$. The %recovery was 99.0-103.0%. The precision, within day, between days and analysts, were acceptable with RSD <3%. Limit of quantitation (LOQ) was 1.81, 1.76 and 1.80%v/v, respectively, while limit of detection (LOD) was 0.18 %v/v. Measurement uncertainty was equal to 0.05 %v/v. As the result, the developed method was suitable to be used for alcohol contents analysis in alcohol-based hand sanitizer products.

Keywords: method validation, alcohol contents, alcohol-based hand sanitizer products, Gas-chromatography

การประเมินคุณภาพชุดทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา สำหรับโรคโควิด-19 เพื่อใช้ในกรณีภาวะเร่งด่วน

สุทธิวัฒน์ ลำไย และคณะกรรมการพิจารณาและประเมินชุดทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคโควิด-19
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับมอบหมายจากที่ประชุม Public Health Emergency Operation Center (EOC) ในวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2563 ให้ดำเนินการวางแผนการเทียบมาตรฐาน Strip test ซึ่งเป็นชุดตรวจหาการติดเชื้อไวรัสโควิด-19 หรือโรคโควิด-19 ที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology test) เพื่อขยายการตรวจในผู้สัมผัสโรคหรือผู้ถูกสงสัยว่ามีการติดเชื้อให้ได้จำนวนมากขึ้นและรวดเร็วขึ้น แต่เนื่องจากในระยะแรกของการระบาดที่มีผู้ป่วยในประเทศจำนวนน้อย จึงมีข้อจำกัดในการจัดหาตัวอย่างพลาสมาหรือตัวอย่างอื่นจากผู้ป่วยสำหรับนำมาใช้ประเมินคุณภาพมาตรฐานด้วยการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยความเห็นชอบร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่เป็นหน่วยงานกำกับควบคุมที่กำหนดให้ชุดตรวจเป็นเครื่องมือแพทย์ประเภทหนึ่ง จึงเห็นควรดำเนินการประเมินคุณภาพด้วยการพิจารณาเอกสารทางวิชาการของชุดตรวจโดยผู้เชี่ยวชาญ แล้วนำผลการพิจารณาไปประกอบการขออนุญาตนำเข้าและขึ้นทะเบียนชุดตรวจจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เพื่อให้มีชุดตรวจที่มีคุณภาพและตอบสนองต่อสถานการณ์ที่เป็นภาวะเร่งด่วนทางสาธารณสุข ซึ่งแนวทางดังกล่าวหน่วยงานอื่นในระดับสากล เช่น US FDA ก็ใช้พิจารณาเพื่ออนุญาตชุดตรวจเฉพาะสำหรับใช้ในสภาวะเร่งด่วน หรือ Emergency used authorization (EUA)^(1,2,3) เช่นเดียวกัน

เกณฑ์การประเมิน^(4,5,6)

คณะกรรมการพิจารณาและประเมินชุดทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคโควิด-19 2019 ได้กำหนดรายการเอกสารทางวิชาการและหลักเกณฑ์คุณภาพมาตรฐานของชุดตรวจเพื่อแสดงถึงประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของชุดตรวจที่ผู้ประกอบการต้องจัดเตรียมเอกสารวิชาการ โดยต้องยืนยันความถูกต้องครบถ้วนด้วยตนเองก่อนยื่นเอกสารทั้งหมดเพื่อให้คณะกรรมการพิจารณา รายการเอกสารประกอบด้วยเอกสารที่แสดงรายละเอียดของชุดตรวจ

Corresponding author Email: Suttiwat.l@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 14 July 2020

Accepted: 22 July 2020

รวมถึงรายละเอียดของฉลากและเอกสารกำกับชุดตรวจ ซึ่งสอดคล้องกับรายการเอกสารที่ต้องยื่นประกอบการขออนุญาตเครื่องมือแพทย์แบบแจ้งรายการละเอียดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

เกณฑ์หลัก (Major criteria) ที่สำคัญจำนวน 4 หัวข้อ ที่ชุดตรวจจำเป็นต้องมีเอกสารแสดงข้อมูล และต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดได้แก่

1. ผลการศึกษาความคงตัว (Stability study) ต้องมีการออกแบบการศึกษา และผลการศึกษาที่สอดคล้องต่อการกำหนดอายุการใช้งานของชุดตรวจ ซึ่งอาจเป็นผลการศึกษาแบบเร่ง (Accelerated stability study)
2. ผลการศึกษาความไวเชิงวินิจฉัย (Diagnostic sensitivity study) ได้แก่ ผลการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างผู้ติดเชื้อโคโรนา 2019 โดยต้องมีแหล่งที่มาของตัวอย่าง วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของตัวอย่าง หรือวิธีการตรวจอ้างอิง รายละเอียดผลการศึกษา โดยเกณฑ์ยอมรับ คือ ต้องมีความไวไม่น้อยกว่าร้อยละ 85 ในกรณีที่เป็นชุดตรวจหาแอนติบอดี และความไวไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 ในกรณีที่เป็นชุดตรวจหาแอนติเจน โดยต้องมีผลการศึกษาไม่น้อยกว่า 50 ตัวอย่าง
3. ผลการศึกษาความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (Diagnostic specificity study) ได้แก่ ผลการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างผู้ไม่ติดเชื้อโคโรนา 2019 โดยต้องมีแหล่งที่มาของตัวอย่าง วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของตัวอย่าง หรือวิธีการตรวจอ้างอิง รายละเอียดผลการศึกษา โดยเกณฑ์ยอมรับ คือ ต้องมีความจำเพาะไม่น้อยกว่าร้อยละ 98 โดยต้องมีผลการศึกษาไม่น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง
4. ผลการศึกษาความไม่จำเพาะ (Non-specificity study) ได้แก่ ผลการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคอื่นที่ไม่ใช่ผู้ติดเชื้อโคโรนา 2019 เช่น ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ ผู้ป่วยที่เป็นโรคทางภูมิคุ้มกัน โดยต้องมีแหล่งที่มาของตัวอย่าง วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของตัวอย่าง รายละเอียดผลการศึกษา โดยเกณฑ์ยอมรับ คือ ต้องให้ผลผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 10 โดยต้องมีผลการศึกษาไม่น้อยกว่า 20 ตัวอย่าง

ผลประเมิน

คณะกรรมการพิจารณาและประเมินชุดทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับโรคโคโรนา 2019 ได้ดำเนินการพิจารณาคำขอประเมินพร้อมเอกสารประกอบจากผู้ประกอบการ ที่ยื่น ณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างวันที่ 16 มีนาคม ถึง 3 เมษายน 2563 จำนวนทั้งสิ้น 101 คำขอ โดยเป็นคำขอยื่นประเมินครั้งแรก 90 คำขอ จากชุดตรวจจำนวน 59 ผลิตรภัณฑ์ (เป็นชุดตรวจแอนติบอดีจำนวน 56 ผลิตรภัณฑ์ และชุดตรวจแอนติเจน จำนวน 3 ผลิตรภัณฑ์) ผลการประเมินพบว่าผ่านเกณฑ์ตาม Major criteria จำนวน 29 จาก 101 คำขอ คิดเป็นร้อยละ 32.22 เมื่อพิจารณาผลการพิจารณาตามรายผลิตรภัณฑ์ พบว่า

ชุดตรวจแอนติบอดีจำนวน 21 จาก 56 ผลิตรภัณฑ์ คิดเป็นร้อยละ 37.5 ให้ผลผ่านเกณฑ์การประเมิน และชุดตรวจแอนติเจนจำนวน 2 จาก 3 ผลิตรภัณฑ์ คิดเป็นร้อยละ 66.7 ให้ผลผ่านเกณฑ์การประเมิน รวมผลิตรภัณฑ์ที่ให้ผลผ่านการประเมินทั้งสิ้น 23 จาก 59 ผลิตรภัณฑ์ คิดเป็นร้อยละ 38.98 ของผลิตรภัณฑ์ทั้งหมด

สรุป

การประเมินด้วยการพิจารณาเอกสารทางวิชาการนั้นเป็นมาตรการในสภาวะเร่งด่วนและมีข้อจำกัด ที่ไม่สามารถดำเนินการทางห้องปฏิบัติการได้ในช่วงเวลาก่อนพฤษภาคม 2563 อย่างไรก็ตามชุดตรวจที่ผ่านการประเมินด้วยวิธีการทางเอกสารได้ถูกประเมินทางห้องปฏิบัติการหลังการได้รับอนุญาตจำหน่ายด้วยแล้ว โดยกรมวิทยาศาสตร์

การแพทย์ได้จัดทำแนวทางการประเมิน ตลอดจนจัดเตรียมตัวอย่างทดสอบ (Panel serum) ที่มีคุณสมบัติถูกต้อง และเหมาะสมและทำการประเมินร่วมกับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ที่ได้รับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

เอกสารอ้างอิง

1. U.S. Food and Drug Administration. Policy for diagnostic tests for coronavirus disease-2019 during the public health emergency: immediately in effect guidance for clinical laboratories, commercial manufacturers, and Food and Drug Administration staff, issued on March 16, 2020. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2020.
2. 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, issued on May 4, 2020. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2020.
3. 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 May 11]; [20 screens]. Available from: <https://www.fda.gov/media/135659/download>.
4. พระราชบัญญัติเครื่องมือแพทย์ พ.ศ. 2531 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 18 (พ.ศ. 2538) เรื่อง ชุดตรวจการติดเชื้อ เอชไอวี. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 112 ตอนที่ 76 ง (วันที่ 21 กันยายน 2538).
5. พระราชบัญญัติเครื่องมือแพทย์ พ.ศ. 2551 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชุดตรวจที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ เอชไอวี. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนพิเศษ 179 ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2552).
6. Ryu SW, Suh IB, Ryu SM, Shin KS, Kim HS, Kim J, et al. Comparison of three rapid influenza diagnostic tests with digital readout systems and one conventional rapid influenza diagnostic test. J Clin Lab Anal 2018; 32(2): e22234. (7 pages).

ใบสมัครเป็นสมาชิก วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชื่อ.....

ที่อยู่.....

อาชีพ.....

โทรศัพท์.....

ต้องการรับ วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เวลา 1 ปี (4 ฉบับ) เป็นเงิน 200.- บาท

ตั้งแต่ปี.....

พร้อมนี้ได้ส่ง

☐ ธนาณัติ

☐ ตัวแลกเงินไปรษณีย์

☐ เงินสด

ส่งจ่าย

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ

ห้องสมุดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซอยโรงพยาบาลบำรุงราศนราดูล ถนนติวานนท์

นนทบุรี 11000 โทร. 0-2589-9850-8 ต่อ 99339

ส่งจ่าย ปณ. กระทรวงสาธารณสุข รหัสไปรษณีย์ 11000

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

The bulletin of the Department of Medical Sciences is an official publication of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It is devoted to the dissemination of knowledge concerning medical sciences and the facilitation of co-operation among scientists.

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Opart Karnkawinpong Somlerk Jeungsamarn	Phichet Banyati Somchai Sangkitporn
Technical Advisor	Amara Vongbuddhapitak Pimjai Naigowit Sumol Pavitranon Pranee ChavalitThumrong	Mayura Kusum Jongdee Wongpinairat Panadda Silva Teeranart Jivapaisarnpong
Editor	Busarawan Sriwanthana	Department of Medical Sciences
Assistant Editor	Duanthanorm Promkhatkaew Suthon Vongsheree Apiwat Tawatsin	Kanokporn Atisook Wichuda Jariyapan Malinee Chittaganpitch
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana Prasert Auewarakul Punnee Pitisuttithum Pathom Sawanpanyalert Pintip Pongpech Suchada Chaisawadi Danai Tiwawech Suwanna Charunut Salakchit Chutipongvivate Padet Siriyasatien Pornpimol Kongtip Srisurang Tantimavanich Nuanchawee Wetprasit Sunee Sirivichayakul Supanee Duangteraprecha Piyada Wangroongsarb Wantana Paveenkittiporn Duangpen Pattamadilok Triporn Wattananat	Siriraj Hospital, Mahidol University Siriraj Hospital, Mahidol University Mahidol University Office of the Permanent Secretary, Ministry of Science and Technology Chulalongkorn University King Mongkut's Institute of Technology Thonburi Naresuan University Huachiew Chalermprakiet University The Association of Medical Technologists of Thailand Chulalongkorn University Mahidol University Mahidol University Ramkhamhaeng University Chulalongkorn University Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Administration	Namfon Noiprasert Prasan Julwong	Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Subscription Rate	The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.\$ 50.00 for all other countries.	
Office	Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297	
Printed by	Thanaaroonkarnpim co., Ltd. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

เปิดใจ ใฝ่รู้ คู่คุณธรรม นำหลักวิชาการ มาตรฐานสากล



<https://bit.ly/3jagHGu>

