

Enhancing the Performance of the CDC Protocol for Real-Time RT-PCR Detection of Influenza A Virus via Post-PCR Melting Curve Analysis

Treewat Watthanachokchai¹, Kingkan Rakmanee¹, Pichet Yutthanakarnwikom¹, Ekawat Pasomsub^{1*} 

¹ Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Background: Influenza has a significant impact on health, society and the economy worldwide.

Objective: To enhance the accuracy and precision of influenza A virus detection.

Methods: Detection of viral genetic material was performed using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), followed by melting curve analysis of the real-time RT-PCR product.

Results: To enhance diagnostic performance, a novel in-house melting curve analysis assay developed for real-time RT-PCR product, achieving a sensitivity of 96.06% (95% CI, 91.05-98.71) and specificity of 100.00% (95% CI, 95.94-100.00). The assay also demonstrated a positive predictive value of 100.00% (95% CI, 97.02-100.00), a negative predictive value of 94.68% (95% CI, 88.29-97.68) and an accuracy of 97.69% (95% CI, 94.68-99.24). The assay showed high concordance with the NxTAG® Respiratory Pathogen Panel (κ , 0.95; 95% CI, 0.91-0.99; SE, 0.02; $P < .001$).

Conclusions: This study demonstrated that post-PCR amplicon analysis via melting curve analysis can be performed in a single tube without interference from the hydrolysis probe. Integrating both methods into the same workflow reduces turnaround time for repeat testing, lowers costs, and minimizes labor requirements. As a result, this combined approach improves the efficiency, sensitivity, and specificity of influenza A virus detection, making it a robust tool for laboratory diagnostics.

Keywords: Real-time RT-PCR, Melting curve analysis, Influenza A virus

Citation: Watthanachokchai T, Rakmanee K, Yutthanakarnwikom P, Pasomsub E. Enhancing the performance of the CDC protocol for real-time RT-PCR detection of influenza A virus via post-PCR melting curve analysis. *Rama Med J.* 2025;48(4):e274725. doi:10.33165/rmj.48.04.e274725

* **Corresponding Author:**
ekawat.pas@mahidol.ac.th

Received: 9 April 2025

Revised: 1 August 2025

Accepted: 5 August 2025

Published: 10 October 2025



Copyright © 2025
by the Author(s).

Licensee RMJ. This article is licensed under the Creative Commons Attribution (CC BY) License.

About the Journal: The Ramathibodi Medical Journal (RMJ) has been operating continuously since 1978. This peer-reviewed journal aims to disseminate research findings, academic progress, and innovations in medicine, biomedical science, public health, and medical education to medical personnel and researchers domestically and abroad. RMJ welcomes various article types, including original research, reviews, and case reports.

Publication Frequency: The journal publishes four issues annually: No.1 in January - March, No.2 in April - June, No.3 in July - September, and No.4 in October - December.

Distribution: The RMJ contents are freely available for our readers to access online, ISSN: 2651-0561 (Online). Current and archived issues are distributed online to our readers worldwide via our website (<https://he02.tci-thaijo.org/index.php/ramajournal>).

Article Processing Charge: RMJ supports the authors in publishing their work without any article processing charge (APC).

Indexing: RMJ has been indexed in the Thai Journal Citation Index (TCI), Google Scholar, and Crossref.

Open Access Policy: RMJ supports open-access publication, allowing anyone to access and read the journal articles without charge.

การเพิ่มประสิทธิภาพการทดสอบ Real-Time RT-PCR ของ CDC สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอโดยการวิเคราะห์ Melting Curve หลังการทำ PCR

ศรวิวัฒน์ วัฒนะโชคชัย¹, กิ่งกาญจน์ รักษ์มณี¹, พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม¹, เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์^{1*} 

¹ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ประเทศไทย

บทคัดย่อ

บทนำ: โรคไข้หวัดใหญ่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัย สังคม และเศรษฐกิจทุกประเทศทั่วโลก

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอให้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

วิธีการศึกษา: การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ โดยใช้เทคนิค real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ตามด้วยการวิเคราะห์ melting curve ของผลิตภัณฑ์ real-time RT-PCR

ผลการศึกษา: วิธีการที่พัฒนาขึ้นพบว่า มีความไว ร้อยละ 96.06 (95% CI, 91.05-98.71) ความจำเพาะ ร้อยละ 100.00 (95% CI, 95.94-100.00) ค่าการพยากรณ์ผลบวก ร้อยละ 100.00 (95% CI, 97.02-100.00) ค่าการพยากรณ์ผลลบ ร้อยละ 94.68 (95% CI, 88.29-97.68) และมีความถูกต้องของการทดสอบ ร้อยละ 97.69 (95% CI, 94.68-99.24) การทดสอบแสดงให้เห็นความสอดคล้องสูงกับ NxTAG® Respiratory Pathogen Panel (κ , 0.95; 95% CI, 0.91-0.99; SE, 0.02; $P < .001$)

สรุป: การวิเคราะห์แอมพลิคอนหลังการทำ PCR ด้วยการวิเคราะห์ melting curve สามารถดำเนินการได้ในหลอดทดลองเดียวกันโดยไม่มีการรบกวนสัญญาณจาก hydrolysis probe การผสมผสานวิธีการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี จะช่วยลดระยะเวลาในการทดสอบซ้ำ ลดต้นทุน และลดความต้องการกำลังคนลง ดังนั้น แนวทางแบบผสมผสานนี้จึงช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพ ความไว และความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ ทำให้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: เทคนิค real-time RT-PCR การวิเคราะห์ melting curve เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ

Citation: Watthanachokchai T, Rakmanee K, Yutthanakarnwikom P, Pasomsub E. Enhancing the performance of the CDC protocol for real-time RT-PCR detection of influenza A virus via post-PCR melting curve analysis. *Rama Med J.* 2025;48(4):e274725. doi:10.33165/rmj.48.04.e274725

* Corresponding Author:
ekawat.pas@mahidol.ac.th

Received: 9 April 2025
Revised: 1 August 2025
Accepted: 5 August 2025
Published: 10 October 2025



Copyright © 2025
by the Author(s).

Licensee RMJ. This article is licensed
under the Creative Commons
Attribution (CC BY) License.

บทนำ

โรคไข้หวัดใหญ่ เป็นโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza viruses)¹ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ เป็นสมาชิกอยู่ใน family *Orthomyxoviridae* ใน genus *Alphainfluenzavirus* ประกอบด้วย influenza A, B, C, และ D² ไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped virus) นิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) มีลักษณะสมมาตรแบบเกลียว (helically symmetric) ซึ่งประกอบด้วยสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (RNA segments) 7 หรือ 8 ส่วน และ แคปซิดโปรตีน (capsid protein) ที่ห่อหุ้มอยู่ร่วมกัน³ อนุภาคไวรัสมีรูปร่างทรงกลม (spherical) หรือ ทรงกลมแบบขีดยาว (filamentous) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 nm ภายในบรรจุสารพันธุกรรมชนิด RNA สายลบเส้นเดียว (negative-sense single-stranded RNA virus หรือ (-) ssRNA virus)⁴ มีขนาดประมาณ 13,588 เบส⁵ มีไกลโคโปรตีน (glycoprotein) แทรกอยู่ยื่นออกมาจากโครงสร้าง มี 2 ชนิด คือ hemagglutinin (HA) และ neuraminidase (NA)³ การจำแนกสายพันธุ์ (strain) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่อิงตามชนิดของ HA (HA subtype) และ NA (NA subtype) ปัจจุบันมี HA ทั้งหมด 18 subtype (H1-H18) และ NA อยู่ 11 subtype (N1-N11)⁶ การเกิด antigenic drift และ antigenic shift เป็นสาเหตุการเปลี่ยนแปลงในส่วน of HA และ NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ยากต่อการป้องกันด้วยวัคซีนแบบดั้งเดิม ทำให้ต้องมี

การปรับเปลี่ยนและพัฒนาวัคซีนใช้หวัดใหญ่อยู่ตลอดเวลา⁷ นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงแอนติเจนยังส่งผลให้ไวรัสสามารถหลบเลี่ยงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและปรับตัวได้ในหลายโฮสต์⁸

จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) โรคไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลมีผู้ป่วยประมาณ 1,000 ล้านคนต่อปี มีผู้เสียชีวิตราว 290,000 ถึง 650,000 คนต่อปี ร้อยละ 99 ของผู้เสียชีวิตที่เป็นเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี มักเกิดในประเทศกำลังพัฒนา⁹ ในช่วง 100 ปีที่ผ่านมา มีผู้เสียชีวิตจากโรคไข้หวัดใหญ่ไม่น้อยกว่า 50-100 ล้านคน มูลค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจมากกว่า 3 ล้านล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือร้อยละ 4.8 ของผลิตภัณฑ์มวลรวมภายในประเทศของโลก (gross domestic product, GDP) ความเสี่ยงจากการแพร่ระบาดของโรคอาจมีมูลค่าความเสียหายอยู่ที่ 30 พันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี จึงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่ทั่วโลกให้ความสำคัญ¹⁰

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์นิยมใช้เทคนิค real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง ใช้เวลาในการตรวจที่รวดเร็ว¹¹ ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่นิยมใช้ real-time RT-PCR โดยดำเนินการตามคำแนะนำของศูนย์ป้องกันและควบคุมโรคของสหรัฐอเมริกา (US Centers for Disease Control and Prevention, CDC)¹² การพัฒนา real-time RT-PCR ตาม US-CDC protocol ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ด้วยการวิเคราะห์ melting curve ภายหลังปฏิกิริยา PCR (post-PCR) ด้วยการเติม DNA binding dye ลงไป เพื่อทำการวิเคราะห์แอมพลิคอน (amplicon) จาก real-time PCR ภายในหลอดทดลองเดียวกัน¹³ จะช่วยให้เพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรม สำหรับในกรณีที่ผลไม่ชัดเจน จะช่วยลดขั้นตอนการทำให้ real-time RT-PCR ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการศึกษา

การออกแบบการศึกษา

พัฒนาวิธีการตรวจ real-time RT-PCR ด้วย US-CDC protocol สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ (influenza A virus) โดยนำ PCR product มาวิเคราะห์ต่อด้วยการวิเคราะห์ melting curve เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ให้มีความไวและความจำเพาะเพิ่มมากขึ้น

การคัดเลือกตัวอย่าง

คัดเลือกตัวอย่างทางคลินิกที่แพทย์สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และมีอาการไข้ (อุณหภูมิ $\geq 37.8^{\circ}\text{C}$) ไอ มีน้ำมูก หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง จากตัวอย่าง nasal swab และ nasopharyngeal swab ที่เหลือจากกระบวนการตรวจวิเคราะห์ (left-over specimen) ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล รวมได้จำนวน 216 ตัวอย่างที่มีปริมาณสำหรับการใช้ในการสกัดสารพันธุกรรมขั้นต่ำ 200 μL

การสกัดสารพันธุกรรม (Nucleic Acid Extraction)

ผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 200 μL สกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัด MagDEA Dx SV ด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ magLEAD 12gC (Precision System Science Co, Ltd, Matsudo, Japan) หลังจากนั้นนำสารพันธุกรรมที่สกัดแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C หรือ -80°C ก่อนทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วย Multiplex PCR-Liquid Chip (NxTAG® Respiratory Pathogen Panel Kit)

เตรียมชุดทดสอบ NxTAG® Respiratory Pathogen Panel kit (Diasorin, Italy) และนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดสารพันธุกรรมด้วย Maglead ปริมาตร 36 μL ใส่ลงในรีเอเจนต์ (reagents) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยอาศัยหลักการ multiplex PCR และ bead hybridization ตาม PCR conditions ที่ระบุในคู่มือ หลังจากนั้นนำไปอ่านด้วยเครื่อง Luminex MAGPIX Instrument

โดยอาศัยหลักการ flow cytometry¹⁴ และแปลผลการทดสอบด้วย xPONENT® software version 4.3 ซึ่งจะแสดงผลการทดสอบเชิงคุณภาพจากการตรวจนับระดับของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจแบบอัตโนมัติ

การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วย Real-Time RT-PCR for US-CDC Protocol

เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วย Real-time PCR แบบปกติทั่วไป หรือในการทดลองนี้เรียก “standard real-time PCR” โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายในส่วน of matrix (M) gene ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ จาก US-CDC protocol (ตารางที่ 1)

ขั้นตอนการเตรียมสารตั้งต้น (master mix preparation step) : ทำการละลาย RNA และชุด SOLIScript One-step Multiplex Probe kit (Solis BioDyne OÜ, Tartu, Estonia) เตรียมไพรเมอร์ โพรบ และส่วนผสมปฏิกิริยา (ตารางที่ 2) ผสมส่วนผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันดีโดยปิเปต (pipette) ขึ้นลง 10 ครั้ง ถ่ายโอนลงในหลอด PCR แบบเรียลไทม์หรือเพลต 96 หลุม ขั้นตอนทั้งหมดควรดำเนินการบนน้ำแข็งและหลีกเลี่ยงการสัมผัสแสง

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA amplification step) : หลังจากเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาเสร็จแล้ว ให้เติม RNA 5 µL จากการสกัด RNA ใส่ตัวควบคุมคุณภาพผลบวก (positive control) และตัวควบคุมคุณภาพผลลบ (negative control) ในทุกการทดลอง ปริมาตรรวมในหลุม คือ 25 µL การกำหนด real-time PCR conditions ของการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ประกอบด้วย ขั้นตอน reverse transcription step ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการทำให้ขั้นตอน inactivation ของ reverse transcription step ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน amplification steps 45 รอบ โดยประกอบด้วย denaturation 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที และขั้นตอน annealing และ DNA extension แบบ 2-step ใช้อุณหภูมิที่ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และบันทึกข้อมูล (data collection) ที่ขั้นตอนนี้ ตามคำแนะนำการใช้งานของผู้ผลิต BioRad CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

ตารางที่ 1. Oligonucleotide Sequence ของ Primers และ Probe จาก US-CDC Protocol¹²

Primer/Probe	DNA Sequence	Specific Region
Flu A-Forward	5'-GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C-3'	Matrix (M) gene
Flu A-Reverse	5'-AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA -3'	Matrix (M) gene
Flu A-FAM	5'-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG -3'-BHQ1	Matrix (M) gene

ตารางที่ 2. การเตรียมส่วนผสมหลัก

Reagent	Microliter/Reaction	Final Concentration
40x One-step SOLIScript Mix	0.5 µL	1x
5x One-step Multiplex Probe Mix	4 µL	1x
Flu A-Forward primer	0.5 µL	1.0 µM
Flu A-Reverse primer	0.5 µL	1.0 µM
Flu A-Probe	0.5 µL	0.25 µM
RNA template	5 µL	-
Water, nuclease free	Up to 20 µL	-
Total reaction volume	20 µL	-

การตรวจ In-House Melting Curve Analysis (IH-MCA) Assay for Real-Time RT-PCR Product

ขั้นตอนการวิเคราะห์ภายหลังจากปฏิกิริยา PCR เสร็จสิ้น (post-PCR analysis step): ทำการเจือจาง SYBR® Green I nucleic acid gel stain (Invitrogen, USA) จาก 10,000x เป็น 10x สำหรับใช้งาน เมื่อปฏิกิริยา real-time PCR สิ้นสุดลง โดยดูดสารละลาย SYBR® Green I ปริมาตร 2.78 μ L (10x) ใส่ลงไปใน PCR product แต่ละหลุม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ SYBR® Green I เท่ากับ 1x ในขั้นตอนการวิเคราะห์ melting curve จะใช้อุณหภูมิที่ 60 °C ถึง 95 °C ที่มีอัตราการปรับอุณหภูมิเท่ากับ 0.5 °C ในเวลา 0.05 วินาที โดยใช้ BioRad CFX 96 สำหรับการวิเคราะห์ melting curve และบันทึกสัญญาณ (data collection) ในขั้นตอนนี้

การแปลผล (result Interpretation): อ่านค่า melting temperature ของ melting curve เปรียบเทียบกับ positive และ negative control กรณีที่มีค่า melting temperature เท่ากับ 81.75 ($\pm$ 1) °C ให้แปลการทดสอบเป็นบวก (positive) กรณีที่มีค่า melting temperature ไม่สอดคล้องกับกรณีการแปลผลการทดสอบเป็นบวก ให้แปลผลการทดสอบเป็นลบ (negative)

หากมีการกลายพันธุ์ภายในบริเวณแอมพลิคอนอาจส่งผลให้ค่า melting temperature (T_m) เปลี่ยนไปจากช่วงที่กำหนด การยืนยันว่าเป็น เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ ในกรณีที่ได้ค่า melting temperature เบี่ยงเบนออกจากช่วงที่กำหนดไว้ สามารถนำตัวอย่างไปตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น เช่น ชุดตรวจมาตรฐาน real-time PCR, DNA sequencing, และ next generation sequencing (NGS) เป็นต้น นอกจากนี้ การนำสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ มาทดสอบเพิ่มเติม จะช่วยกำหนดขอบเขตของค่า melting temperature ที่สามารถระบุเชื้อก่อโรคได้อย่างแม่นยำและอาจนำไปสู่การจัดเกณฑ์เฝ้าระวังสำหรับการตรวจพบ mutated strain ในการใช้การวิเคราะห์ melting curve ต่อไป

การประเมินประสิทธิภาพ (Diagnostic Performance Evaluation)

เปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่าง IH-MCA) assay for real-time RT-PCR product และ multiplex PCR-liquid chip (NxTAG® Respiratory Pathogen Panel kit) เพื่อวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าการพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value, PPV) ค่าการพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value, NPV) ความถูกต้อง (accuracy) และความสอดคล้องของวิธีทดสอบ จะถูกวัดโดยค่าสถิติ Kappa (κ) ซึ่งจะคำนวณโดยใช้โปรแกรม MedCalc version 23.3.4 (MedCalc Software, Ltd), R version 4.3.2 (R Project for Statistical Computing), และ RStudio version 2024.09.0-375 (R Project for Statistical Computing) ส่วนการประเมินภาพรวมของวิธีที่พัฒนาขึ้น จะพิจารณาจากคุณสมบัติของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ราคา และระยะเวลาการทดสอบ

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างทั้งหมด 216 ตัวอย่าง ผ่านการทดสอบด้วย multiplex PCR-liquid chip (NxTAG® Respiratory Pathogen Panel kit) ให้ผลการทดสอบเป็นตัวอย่างบวก 127 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างลบ 89 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลการตรวจเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ระหว่าง standard real-time PCR และ IH-MCA assay for RT-PCR product โดยใช้ multiplex PCR-liquid chip (NxTAG® Respiratory Pathogen Panel kit) เป็นชุดตรวจอ้างอิง (ตารางที่ 3)

วิธี IH-MCA assay for RT-PCR product ให้ผลการทดสอบบวกตรงกัน 122 ตัวอย่าง ให้ผลการทดสอบลบตรงกัน 89 ตัวอย่าง และให้ผลการทดสอบเป็นลบปลอม 5 ตัวอย่าง มีค่าความไว อยู่ที่ 96.06% (95% CI, 91.05-98.71) ความจำเพาะ ที่ 100.00% (95% CI, 95.94-100.00) ค่าการพยากรณ์ผลบวก เท่ากับ 100.00% (95% CI, 97.02-100.00) และค่าการพยากรณ์ผลลบ อยู่ที่ 94.68% (95% CI, 88.29-97.68) โดยมีความถูกต้องของการทดสอบเท่ากับ 97.69% (95% CI, 94.68-99.24) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพและความสอดคล้องของวิธีการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง NxTAG® Respiratory Pathogen Panel มีความแม่นยำสูง มีความสอดคล้องที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (κ , 0.95; 95% CI, 0.91-0.99; SE, 0.02; $P < .001$)

ตารางที่ 3. ผลการทดสอบเปรียบเทียบวิธีอ้างอิงของ Standard Real-Time PCR และ IH-MCA Assay for RT-PCR Product

Method	Real-Time PCR	
	Standard	IH-MCA Assay for RT-PCR Product
True positive	120	122
False positive	0	0
False negative	7	5
True negative	89	89

Abbreviations: IH-MCA, in-house melting curve analysis; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

การทดสอบไม่พบปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) กับเชื้อก่อโรคสายพันธุ์อื่น โดยใช้ตัวอย่าง clinical isolate ของแต่ละสายพันธุ์ จำนวนสายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ adenovirus (ADV), coronavirus NL63 (CoV-NL63), coronavirus OC43 (CoV-OC43), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), influenza B virus (Flu B), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), herpes simplex virus type 1 (HSV-1), herpes simplex virus type 2 (HSV-2), human metapneumovirus (hMPV), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Legionella species* (*Legionella* sp.), *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*), parainfluenza virus type 3 (PIV3), parainfluenza virus type 4 (PIV4), *Pneumocystis jirovecii* (PCP), human parvovirus B19 (PVB19), respiratory syncytial virus (RSV), rhinovirus, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Toxoplasma gondii* (TOX), และ varicella-zoster virus (VZV)

การประเมินภาพรวมของวิธีที่พัฒนาขึ้น สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบระหว่าง US-CDC protocol ในกรณีการทดสอบซ้ำทุกขั้นตอน (conduct repeated testing) การทดสอบซ้ำอีกครั้งเฉพาะ PCR (repeat PCR only) และการทดสอบแบบ IH-MCA assay for RT-PCR product พบว่า มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยแตกต่างกันเล็กน้อย ในด้านต้นทุน (costs) มีความแตกต่างกันมาก การทดสอบซ้ำโดยวิธีแบบปกติมีต้นทุน 272.15 บาท การทดสอบซ้ำเฉพาะ PCR มีต้นทุน 102.15 บาท และ IH-MCA assay for RT-PCR product มีต้นทุนต่ำสุดเพียง 32.06 บาท (เฉพาะราคาต้นทุน SYBR Green I ต่อ 1 ตัวอย่าง มีต้นทุนเท่ากับ 1 สตางค์) ด้านระยะเวลาการทดสอบ การทดสอบซ้ำโดยวิธีแบบปกติใช้เวลา 2.15 ชั่วโมง การทดสอบซ้ำเฉพาะ PCR ใช้เวลา 1.44 ชั่วโมง และ IH-MCA assay for RT-PCR product ใช้เวลาน้อยสุดเพียง 0.30 ชั่วโมง (ตารางที่ 4)

แนวทางในการรายงานผลบวกไม่จำเป็นต้องมีการทดสอบซ้ำทุกราย การเพิ่มขั้นตอนการวิเคราะห์ melting curve แนะนำให้นำมาใช้แทนการทดสอบซ้ำในกรณีที่ผลคลุมเครือ เช่น ในกรณีที่มิสสัญญาณเกิดขึ้นเหนือเส้น baseline threshold ในช่วงท้ายของปฏิกิริยา real-time PCR เมื่อตัวอย่างที่ทดสอบนั้นไม่เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ สามารถนำตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการทำ real-time PCR มาแล้วก่อนหน้านี้ ทดสอบเพิ่มเติมด้วยการวิเคราะห์ melting curve

สำหรับการวิเคราะห์ต้นทุนควรนำต้นทุนของหลอดทดลองที่ใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพผลบวกและตัวควบคุมคุณภาพผลลบ มารวมการคำนวณด้วย เนื่องจากการทดสอบในทุกครั้ง สำหรับการวิเคราะห์ melting curve โดยทั่วไปสามารถทำการวิเคราะห์ melting temperature ของตัวควบคุมคุณภาพผลบวกและตัวควบคุมคุณภาพผลลบได้ ภายในรอบการทดสอบเดียวกันโดยไม่มีขั้นตอนและค่าใช้จ่ายเพิ่มเติม ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับการทดสอบซ้ำ เนื่องจากช่วยเพิ่มความถูกต้องลดค่าใช้จ่ายในด้านต้นทุนและระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ที่สั้นลง

ตารางที่ 4. ประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ ต้นทุน และเวลาที่ใช้ สำหรับตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ

Topic	Real-Time PCR					
	Conduct Repeated Testing		Repeated PCR Only		IH-MCA Assay for RT-PCR Product	
Diagnostic	Value, %	95% CI	Value, %	95% CI	Value, %	95% CI
Sensitivity	94.49	88.97-97.76	94.49	88.97-97.76	96.06	91.05-98.71
Specificity	100.00	95.94-100.00	100.00	95.94-100.00	100.00	95.94-100.00
PPV	100.00	96.97-100.00	100.00	96.97-100.00	100.00	97.02-100.00
NPV	92.71	86.09-96.31	92.71	86.09-96.31	94.68	88.29-97.68
Accuracy	96.76	93.44-98.69	96.76	93.44-98.69	97.69	94.68-99.24
Costs	Number	Price, ฿	Number	Price, ฿	Number	Price, ฿
DNA extraction	1 Rx	170.00	None	0	None	0
Reagent	1 Rx	54.00	1 Rx	54.00	1 Rx	0.01
Materials	1 well	48.15	1 well	48.15	1 well	32.05
Total		272.15		102.15		32.06
Turnaround Time	Work Flow for Conduct Repeated Testing		Work Flow for PCR Only		Work Flow for IH-MCA Assay for RT-PCR Product	
Time	2 h 15 min		1 h 44 min		30 min	

Abbreviations: IH-MCA, in-house melting curve analysis; NPV, negative predictive value; PCR, polymerase chain reaction; PPV, positive predictive value; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; Rx, reaction.

อภิปรายผล

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วย IH-MCA assay for RT-PCR product อาศัยหลักการ real-time PCR ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ หลักการทดสอบแบบ hydrolysis probe detection และการวิเคราะห์ melting curve โดยเริ่มจากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA เป้าหมายและวิเคราะห์สัญญาณด้วย hydrolysis probe ในหลอดทดลอง หลังจากนั้นนำเอา PCR products มาทำการวิเคราะห์ melting curve analysis ซึ่งเป็นกระบวนการตรวจวิเคราะห์หลังจาก PCR เสร็จสิ้นแล้ว (post-PCR) ต่างจากการศึกษาของ Lind และคณะ¹⁵ Cheah และคณะ¹⁶ รวมทั้ง Van Poucke และคณะ¹⁷ ซึ่งเป็นการเตรียม sequence-specific probes และ DNA binding dyes ก่อนเริ่มปฏิกิริยา real-time PCR (pre-PCR) ซึ่งเป็นการเตรียมสารละลายต่าง ๆ ไว้ในหลอดเดียวกัน โดยจะทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบเมื่อปฏิกิริยา real-time PCR สิ้นสุดลงแล้ว

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่า hydrolysis probe ที่ใช้ในขั้นตอน real-time PCR ไม่ก่อให้เกิดสัญญาณรบกวนในการวิเคราะห์ melting curve เนื่องจากโมเลกุลของ fluorophore เช่น FAM ไม่มีคุณสมบัติเป็น DNA binding dye จึงไม่สามารถแข่งขันเพื่อทำปฏิกิริยาในการจับกับ DNA สายคู่ หรือรบกวนกระบวนการวิเคราะห์ melting curve ได้ นอกจากนี้ โพรบจะถูกละลายโดยเอนไซม์ DNA polymerase ทำให้ fluorophore แยกตัวออกจากสาย DNA และไม่ส่งผลต่อการตรวจวัดด้วยอุณหภูมิที่ DNA ค่อย ๆ สลายพันธะคู่ในขั้นตอนการวิเคราะห์ melting curve

กลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเป็นผลลบปลอม (false negative) จำนวน 7 ราย สำหรับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอนั้น พบว่า มีตัวอย่าง 2 ราย เมื่อยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธีอื่นพบว่า ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ ส่วนตัวอย่างที่เหลืออีก 5 ราย ใน standard real-time PCR และ IH-MCA assay for RT-PCR product ที่ให้ผลเป็นลบอาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของ RNA (RNA degradation) ในกระบวนการจัดเก็บหรือขนส่งตัวอย่างก่อนการทดสอบ

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของเชื้อก่อโรค 22 สายพันธุ์ ไม่พบการเพิ่มขยายชิ้นส่วนสารพันธุกรรมเกิดขึ้น เนื่องจากทาง US-CDC มีการออกแบบไพรเมอร์ที่ดีและบริเวณยีนเป้าหมายเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์สูงจึงทำให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ แม้ในบางกรณี แอมพลิคอนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอก็มีค่า melting temperature ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีสาเหตุจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอมีการกลายพันธุ์ในส่วนของ Matrix (M) gene ส่งผลให้ amplification curve¹⁸ และ melting temperature มีความแตกต่างกันจากการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอดังกล่าว

ดังนั้น ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอด้วย real-time RT-PCR สามารถนำมาวิเคราะห์ต่อได้ด้วยการวิเคราะห์ melting curve อย่างไรก็ตาม หากผลการทดสอบของทั้ง 2 วิธี สอดคล้องกันก็สามารถยืนยันได้ว่าการทำ real-time PCR และการวิเคราะห์ melting curve ให้ผลถูกต้องและสอดคล้องกัน เนื่องจากค่า melting temperature ที่นำมาวิเคราะห์นั้น ได้มาจากชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่มาจากโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (oligonucleotide primers) ชุดเดียวกัน ในกรณีที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันเราสามารถนำมาใช้เป็นข้อสังเกตหรือการแจ้งเตือน เพื่อทำการทดลองซ้ำใหม่อีกครั้ง โดยใช้น้ำยาเดิมกล่องใหม่ หรือใช้ชุดน้ำยาใหม่จากบริษัทอื่น หรือใช้วิธีการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอเพื่อวิเคราะห์และยืนยันผลการทดสอบซ้ำอีกครั้ง เพื่อการสนับสนุนการวินิจฉัยของแพทย์และส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาพยาบาลที่ถูกต้อง ซึ่งจะช่วยลดอัตราการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตจากรักษาพยาบาลด้วยโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอลงได้

สรุปผล

IH-MCA assay for RT-PCR product ที่ได้รับการพัฒนาจาก US-CDC protocol สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือทางการแพทย์ในการตรวจวิเคราะห์และยืนยันเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ โดยมีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมเพียง 32 บาท ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการยืนยันผลการทดสอบได้ถึง 4.5 เท่า และลดผลลบปลอมได้ถึง 1.4 เท่า ทำให้ผู้ป่วยได้รับผลวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

Additional Information

Acknowledgments: The authors would like to express their sincere gratitude to the Virology Laboratory and the Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, for their support and facilitation of this research.

Ethics Approval: The study was approved by the Human Research Ethics Committee, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University (MURA2022/136 on 2 March 2022).

Clinical Trial Consideration: This study does not report on a clinical trial.

Financial Support: No financial support was provided for this study.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions:

Conceptualization: Treewat Watthanachokchai

Data Curation: Treewat Watthanachokchai, Kingkan Rakmanee

Formal Analysis: Treewat Watthanachokchai, Kingkan Rakmanee

Investigation: Treewat Watthanachokchai

Methodology: Pichet Yutthanakarnwikom, Ekawat Pasomsub

Project Administration: Treewat Watthanachokchai

Resources: Treewat Watthanachokchai, Kingkan Rakmanee, Ekawat Pasomsub

Supervision: Pichet Yutthanakarnwikom

Validation: Pichet Yutthanakarnwikom, Ekawat Pasomsub

Visualization: Treewat Watthanachokchai, Kingkan Rakmanee

Writing – Original Draft: Treewat Watthanachokchai, Kingkan Rakmanee

Writing – Review & Editing: Pichet Yutthanakarnwikom, Ekawat Pasomsub

References

1. Influenza in children. *Paediatr Child Health*. 2005;10(8):485-487. doi:10.1093/pch/10.8.485
2. Liang Y. Pathogenicity and virulence of influenza. *Virulence*. 2023;14(1):2223057. doi:10.1080/21505594.2023.2223057
3. Couch RB. Orthomyxoviruses. In: Baron S, ed. *Medical Microbiology*. 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
4. Noda T. Native morphology of influenza virions. *Front Microbiol*. 2012;2:269. doi:10.3389/fmicb.2011.00269
5. Winter G, Fields S. Nucleotide sequence of human influenza A/PR/8/34 segment 2. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(6):2135-2143. doi:10.1093/nar/10.6.2135
6. Centers for Disease Control and Prevention. Avian Influenza Type A Viruses. 20 December 2024. Accessed 1 August 2025. <https://www.cdc.gov/bird-flu/about/avian-influenza-type-a.html>
7. Kim H, Webster RG, Webby RJ. Influenza virus: dealing with a drifting and shifting pathogen. *Viral Immunol*. 2018;31(2):174-183. doi:10.1089/vim.2017.0141
8. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008;26(Suppl 4):D49-D53. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.039
9. World Health Organization. Influenza (seasonal). 28 February 2025. Accessed 1 August 2025. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
10. Jonas OB. *Pandemic Risk*. World Bank; 2013. Accessed 1 August 2025. https://www.worldbank.org/content/dam/Worldbank/document/HDN/Health/WDR14_bp_Pandemic_Risk_Jonas.pdf

11. Spackman E, Suarez DL. Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol.* 2008;436:19-26. doi:10.1007/978-1-59745-279-3_4
12. Shu B, Wu KH, Emery S, et al. Design and performance of the CDC Real-Time Reverse Transcriptase PCR Swine Flu Panel for detection of 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(7):2614-2619. doi:10.1128/JCM.02636-10
13. Nagy A, Černíková L, Vitásková E, et al. Correction: Meltman: optimization, evaluation, and universal application of a qPCR system integrating the TaqMan qPCR and melting analysis into a single assay. *PLoS One.* 2018;13(4):e0196444. doi:10.1371/journal.pone.0196444
14. Luminex. Luminex Detection Methods - Molecular Diagnostics & Life Sciences YouTube page. 13 November 2017. Accessed 1 August 2025. <https://www.youtube.com/watch?v=oJcDk5I39y8>
15. Lind K, Ståhlberg A, Zoric N, Kubista M. Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *Biotechniques.* 2006;40(3):315-319. doi:10.2144/000112101
16. Cheah ES, Malkin J, Free RC, et al. A two-tube combined TaqMan/SYBR green assay to identify mycobacteria and detect single global lineage-defining polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Diagn.* 2010;12(2):250-256. doi:10.2353/jmoldx.2010.090030
17. Van Poucke M, Van Zeveren A, Peelman LJ. Letter to the editor: combined FAM-labeled TaqMan probe detection and SYBR green I melting curve analysis in multiprobe qPCR genotyping assays. *Biotechniques.* 2012;52(2):81-86. doi:10.2144/000113808
18. Duh D, Blažič B. Single mutation in the matrix gene of seasonal influenza A viruses critically affects the performance of diagnostic molecular assay. *J Virol Methods.* 2018;251:43-45. doi:10.1016/j.jviromet.2017.10.007