

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจหาสารพันธุกรรมของ เชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วย Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว เทียบกับแบบมาตรฐาน

มิณซ์ ครามอยู่ กมลวรรณ ศิริวัฒนกุล คุณากร คณา และ ดร.ณิ อูเทนนาม

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร

บทคัดย่อ

ชุดตรวจ Cobas® SARS-CoV-2 มีกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม และการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมรวมถึงการตรวจวัดสัญญาณของ fluorescent ของตัวตรวจจับ (TaqMan Probe) ด้วยวิธี Multiplex Real-time RT-PCR ในเครื่องเดียวกัน โดยยื่นเป้าหมายคือบริเวณตำแหน่ง Open Reading Frame (ORF 1a/b) และ Nucleocapsid Protein (N) Gene ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจและรายงานผลประมาณ 20 นาที ความไวของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ SARS-CoV-2 (Sensitivity): 0.012 TCID50/mL or 12 copies/mL การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงวิเคราะห์ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพ ความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง ของการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยวิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว เปรียบเทียบกับวิธี Real time RT-PCR ปกติ ในกลุ่มตัวอย่าง 60 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า วิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว ให้ผลตรงกับวิธีมาตรฐาน คิดเป็นความไว (sensitivity) 100% และความจำเพาะ (specificity) 100% ที่ค่าระดับความเชื่อมั่น 95% CI มีช่วงค่าความเชื่อมั่น (confident interval) อยู่ที่ 88.40% - 100% การตรวจยืนยันผู้ติดเชื้ออย่างรวดเร็ว จะช่วยผู้ป่วยให้ได้รับการรักษา ทั้งยังสามารถสนับสนุนภารกิจทางทหาร เมื่อได้รับการร้องขอ เครื่องมือการตรวจยืนยันผลการวินิจฉัยในขั้นตอนเดียว สามารถลดระยะเวลา และต้นทุนในการตรวจ ผลลัพธ์ที่ได้จะสามารถนำมาเป็นแนวทางในการปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการ อันจะเป็นประโยชน์ในการสนับสนุนงานทางด้านบริการทางการแพทย์แก่กองทัพบก ลดความสูญเสียอันมีเหตุจากการติดเชื้อโรคโควิด 19 และควบคุมการแพร่ระบาดของโรคต่อไป

คำสำคัญ: โควิด19 ● SARSCoV-2 ● Real time RT-PCR ● Cobas Liat
เวชสารแพทย์ทหารบก 2568;78(1):3-12.

ได้รับต้นฉบับ 27 กันยายน 2567 แก้ไขบทความ 17 ธันวาคม 2567 รับลงตีพิมพ์ 26 กุมภาพันธ์ 2568

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ มิณซ์ ครามอยู่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ผู้ประสานงาน: ดร.ณิ อูเทนนาม E-mail: Steadfast.minzo@gmail.com 085-849-9593

Original article

Efficiency study of a One-step RT-PCR compared with Real-time RT-PCR for SARS-CoV-2.

Min Kramyoo, Kamonwan Siri wattanakul, Kunakorn Kana and Darunee Utennam

Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand

Abstract

The COVID-19 pandemic was caused by SARS-CoV-2 infections. RTA-AFRIMS provided real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR), one of the gold standards for SARS-CoV-2 detection, in response to the pandemic and in support of its military missions and Thai public health. The Cobas Liat SARS-CoV-2 system, which was the first U.S. Food and Drug Administration authorized Point-of-Care RT-PCR test, was claimed to offer highly sensitive and rapid SARS-CoV-2 nucleic acid detection. Considering the potential establishment of this new diagnostic technology in the RTA-laboratory, we evaluated its efficiency, sensitivity, and specificity.

Sixty nasopharyngeal swabs in viral transport medium were tested by both real-time RT-PCR and the Cobas Liat SARS-CoV-2 system. The results from the two procedures were then analyzed for sensitivity and specificity. The results of the two assays showed 100% agreement, for both positive and negative samples, with a correlation level of 0.98. The Point-of-Care Cobas Liat SARS-CoV-2 system produced results concordant with real-time RT-PCR and required less time and processing. Based on this assessment, the system was established in the diagnostic laboratory to support both military and civilian tasks.

Keywords: COVID-19 ● SARS-CoV-2 ● real-time RT-PCR ● Cobas Liat
RTA Med J 2025;78(1):3-12.

Received 27 September 2024 Corrected 17 December 2024 Accepted 26 February 2025

Correspondence should be addressed to CAPT Min Kramyoo Armed Forces Research Institute of Medical Sciences Corresponding Author:
Darunee Utennam, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand E-mail: Steadfast.minzo@gmail.com
085-849-9593

บทนำ

เชื้อไวรัสโควิด-19 (Covid-19) เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีการแพร่ระบาดใหญ่ทั่วโลก โดยมีการระบาดครั้งแรกในช่วงปลายปี พ.ศ. 2562 และได้รับการประกาศให้เป็นโรคระบาดใหญ่ทั่วโลก (Pandemic) โดยองค์การอนามัยโลก¹ ในเดือนมีนาคม พ.ศ.2563 ซึ่งในปัจจุบันได้มีรายงานจากWHO ณ วันที่ 27 กันยายน พ.ศ. 2565 มีผู้ป่วยติดเชื้อยืนยันสะสมทั่วโลกอยู่ที่จำนวน 612,236,677 ราย เสียชีวิตจำนวน 6,514,397 ราย โดยประเทศไทยมีผู้ป่วยติดเชื้อยืนยันสะสมอยู่ที่ 4,678,671 ราย เสียชีวิตจำนวน 32,726 ราย² ซึ่งจากสถานการณ์ปัจจุบันพบผู้ติดเชื้อรายใหม่น้อยลง โดยตั้งแต่ มกราคม - ธันวาคม 2567 พบผู้ติดเชื้อ 45,415 รายและผู้เสียชีวิตจำนวน 220 ราย³

โรคโควิด 19 เกิดจากโคโรนาไวรัสสายพันธุ์ใหม่ เป็นไวรัสอาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดสายเดี่ยว ที่ยังไม่เคยพบมาก่อน จึงเรียกไวรัสชนิดนี้อย่างไม่เป็นทางการว่า “nCoV-2019” มีที่มาจากคำว่า New Coronavirus 2019 ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศชื่อโรคนี้อย่างเป็นทางการว่า “COVID-19” (โควิด19) มาจากคำว่า “Coronavirus Disease 2019” หมายถึงโรคที่เกิดจากไวรัสโคโรนาที่ระบาดในปี 2019 ซึ่งในวันเดียวกัน คณะกรรมการระหว่างประเทศว่าด้วยอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV) ประกาศว่าไวรัส nCoV-2019 เป็นสายพันธุ์ของไวรัสโคโรนาที่เกี่ยวข้องกับโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงเช่นเดียวกับโรค SARS จึงเรียกชื่อไวรัสนี้ว่า Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดการติดเชื้อทางเดินหายใจ โดยผู้ที่ติดเชื้อร้อยละ 80 จะไม่แสดงอาการ บางรายมีอาการแบบโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนบน เช่น เจ็บคอก น้ำมูกไหล ผู้ติดเชื้อประมาณร้อยละ 15 จะมีอาการชัดเจน เช่น ไอ และไอมีเสมหะ บางรายอาจจะมีไข้ โดยเฉพาะผู้สูงอายุที่อาจมีไข้ หายใจเร็ว หอบจากปอดบวม และอาจมีอาการอุจจาระร่วงร่วมด้วย ส่วนผู้ติดเชื้อร้อยละ 5 จะมีอาการป่วยรุนแรง หายใจเร็ว หอบ จนถึงการหายใจล้มเหลวและอาจเกิดภาวะช็อคได้⁴

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยันโรคโควิด 19 โดยเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งมีความจำเพาะสูง ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ และมีข้อจำกัดในการต้องใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งในการตรวจวิเคราะห์จนถึงการออกผลหนึ่งรอบจะใช้เวลาประมาณ 3 – 5 ชั่วโมง และอาจนานขึ้นหากมีจำนวนการส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก

การทดสอบแบบ One-step RT-PCR เป็นการทดสอบด้วยชุดตรวจ Cobas® SARS-CoV-2 Nucleic Acid Test ใช้งานร่วมกับเครื่องมือ Cobas Liat System ซึ่งเป็นเครื่องมือทดสอบกรดนิวคลีอิกแบบอัตโนมัติ ที่ใช้วิธีการ Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 จากตัวอย่างที่ได้จากการเก็บด้วยไม้สวอปทางจมูก (anterior nasal swab) และโพรงจมูกส่วนลึก (nasopharyngeal swab) จากผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อ รวมถึงผู้ที่ไม่มีอาการแต่เสี่ยงในการติดเชื้อทางเดินหายใจ การทดสอบนี้สามารถตรวจหาได้อย่างรวดเร็วสะดวกและแม่นยำเพื่อช่วยในการวินิจฉัยทางคลินิกและควบคุมการติดเชื้อ⁵ ทำการตรวจหาแบบเรียลไทม์ และแปลผลการทดสอบไปที่หน้าจอแสดงผล ใช้เวลาทดสอบประมาณ 20 นาที เหมาะสำหรับการตรวจที่ต้องการผลการตรวจหาแบบเร่งด่วน มีความสะดวกเนื่องจากเป็นระบบอัตโนมัติ อุปกรณ์มีขนาดเล็ก ใช้งานง่าย และยังช่วยลดการปนเปื้อนที่เกิดจากการทำงานได้ (ตารางที่ 1)

รายละเอียด	Real-time PCR	Cobas® SARS-CoV-2
หลักการ	การตรวจหา ยีน ORF 1a/b ยีน E และ ยีน N ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2	ตรวจหา ORF 1a/b และยีน N ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2
ขั้นตอน	1. เก็บตัวอย่าง 2. สกัด RNA จากตัวอย่าง น้ำลายหรือ Swab 3. ทำปฏิกิริยา Reverse Transcription เพื่อเปลี่ยน RNA เป็น cDNA 4. เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน cDNA 5. อ่านผลการทดสอบผ่านกราฟเครื่อง Real time PCR	1. เก็บตัวอย่าง 2. ใส่ตัวอย่างลงในเครื่อง Cobas Liat Analyzer เครื่องจะสกัด RNA, ทำการเพิ่มจำนวนยีน และอ่านผลโดยอัตโนมัติ 3. ผลการทดสอบแสดงที่จอแสดงผล
ความเร็ว	4-8 ชั่วโมง ต่อ 1 - 90 ตัวอย่าง	20-30 นาที ต่อ 1 ตัวอย่าง
ราคา	ประมาณ 1,000 บาท/ตัวอย่าง	ประมาณ 1,300 บาท/ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจ Covid-19 ระหว่างวิธี Real time PCR และวิธีแบบขั้นตอนเดียวด้วยเครื่อง Cobas® Liat SARS-CoV-2

เนื่องจากสถานการณ์ปัจจุบันพบการระบาดของโรคโควิด 19 เป็นจำนวนมาก การตรวจยืนยันผู้ติดเชื้ออย่างรวดเร็ว จะช่วยผู้ป่วยได้รับการรักษา ทั้งยังสามารถสนับสนุนการตรวจให้กับภารกิจทางทหารเมื่อได้รับการร้องขอ ดังนั้น แผนกจุลชีววิทยา กองวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร จึงได้พัฒนาขั้นตอนการปฏิบัติงานเป็นแบบการตรวจยืนยันผลการวินิจฉัยในขั้นตอนเดียว เพื่อลดระยะเวลา และต้นทุนในการตรวจ ผลลัพธ์ที่ได้จะสามารถนำมาเป็นแนวทางในการปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการ อันจะเป็นประโยชน์ในการสนับสนุนงานทางด้านการบริการทางการแพทย์แก่กองทัพบก ลดความสูญเสียอันมีเหตุจากการติดเชื้อโรคโควิด 19 และควบคุมการแพร่ระบาดของโรคต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพ ความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง ของการตรวจวิเคราะห์หาโรค COVID-19 ด้วยชุดตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 แบบขั้นตอนเดียว

2 เพื่อศึกษาถึงความสอดคล้องของผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 แบบขั้นตอนเดียวกับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2) ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

รูปแบบการศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงวิเคราะห์ ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพ ความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยวิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียวเปรียบเทียบกับวิธี Real time RT-PCR ปกติ โดยตัวอย่างจะถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยทั้งสองวิธีควบคู่กัน

วิธีการศึกษา

ก. ประชากรเป้าหมาย ตัวอย่างที่ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา แผนกจุลชีววิทยา กองวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ระหว่างเดือน ตุลาคม 2564 - กันยายน 2565 จำนวน 3,000 ตัวอย่าง

ข. การเลือกตัวอย่าง กลุ่มตัวอย่างได้รับการคัดเลือกแบบเฉพาะเจาะจง ประกอบด้วย ตัวอย่างที่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 และตัวอย่างที่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 กรณีที่ประชากรมีจำนวนแน่นอน (Finite population) สามารถคิดสูตรที่ใช้ในการคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่าง ของ Lwanga & Lemshow, 1991

โดยการกำหนดตัวอย่างเพื่อประมาณค่าสัดส่วนของประชากร และยอมให้มีความคลาดเคลื่อนจากค่าในประชากรไม่เกิน 3% ($d = 0.03$) ด้วยความเชื่อมั่น 97 % (ตารางแจกแจง ค่า $z = 2.17$) ค่า P คำนวณจากค่าประเมินที่ยอมรับได้ของการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยชุดตรวจ ANDiS FAST SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit (Percent Agreement) ร้อยละ 99 ดังนั้น ค่า P จึงเท่ากับ 0.99 ได้ขนาดตัวอย่างจำนวน 52 ตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือ ร่วมกับการประมาณการจากการสำรวจพื้นที่ ผู้วิจัยจึงคาดว่าจะสามารถเก็บจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง โดยทำการคัดเลือกตัวอย่างที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง การเลือกกลุ่มตัวอย่างเป็นการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive sampling) เป็นการเลือกกลุ่มตัวอย่างโดยพิจารณาจากข้อมูลผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการที่มีเฉพาะเลขรหัสของตัวอย่าง ลักษณะของกลุ่มที่เลือกเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วย ชุดน้ำยา ANDiS FAST SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit ขั้นตอนการตรวจมีดังนี้

1.1 สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างด้วย ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 เป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ร่วมกับระบบสกัดแบบอัตโนมัติหลักการ magnetic beads-based ในการสกัดแยกสารพันธุกรรมของอาร์เอ็นเอไวรัสจากตัวอย่างชีวภาพ สกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจที่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรสารพันธุกรรมสุดท้าย (Elution Volume) มีปริมาตรประมาณ 100 ไมโครลิตร

1.2 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วย ชุดน้ำยา ANDiS FAST SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit ใช้หลักการเพิ่มปริมาณ RNA เป้าหมายที่จำเพาะเจาะจง ด้วยเทคนิค Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ชุดน้ำยาสามารถตรวจวิเคราะห์หาชิ้นเป้าหมายของเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ORF1ab, N gene และ E gene ได้พร้อมกันในหลอดเดียวกัน

2. การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อ Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) จากสิ่งส่งตรวจ nasopharyngeal swab ด้วยชุดตรวจ Cobas® SARS-CoV-2 ขั้นตอนการตรวจมีดังนี้

2.1 หยอดตัวอย่าง ใส่ตลับทดสอบ 200 ไมโครลิตร

2.2 สแกนบาร์โค้ดของตลับทดสอบ

2.3 หลังจากใส่ตลับทดสอบที่มีตัวอย่างของผู้ป่วยลงในเครื่องเรียบร้อยแล้ว เครื่องจะดำเนินการเตรียมตัวอย่าง เพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก วัดปริมาณแสง

2.4 เมื่อเครื่องทำการตรวจวิเคราะห์เสร็จสิ้น ประตูดของเครื่องจะปลดล็อคอัตโนมัติ ให้นำ Assay tube ออกจากเครื่องช้าๆ และระมัดระวัง และให้ทิ้ง assay tube ลงใน Biohazard waste

การแปลผล

SARS-CoV2 Not Detected หมายถึง ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV2

SARS-CoV2 Detected หมายถึง ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV2

การวัดผลการวิจัย

ผลการวิจัยที่ต้องการคือ ผลจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วย ชุดตรวจ Cobas® SARS-CoV-2 เป็นชุดตรวจที่ใช้กับเครื่องตรวจอัตโนมัติ Cobas® Liat® system เปรียบเทียบกับ ผลจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วย ชุดตรวจ Wondfo U-Card DxTM Automatic Rapid Molecular Diagnostic Instrument

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลผลการทดลองเป็นอิเล็กทรอนิกส์ไฟล์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

สถิติ คำนวณค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่ากลาง ค่าต่ำสุด และค่าสูงสุดของค่า Ct ร่วมกับ

สถิติอนุมาน (Inferential statistics) การประมาณค่าสัดส่วนและนำเสนอช่วงความเชื่อมั่น 97% (97% confidence interval) ของความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ความถูกต้อง (Accuracy) ค่าทำนายเมื่อผลเป็นบวก Positive Predictive Value (PPV) และ ค่าทำนายเมื่อผลเป็นลบ Negative Predictive Value (NPV) ขึ้นกับอุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 โดยวิธี Gold Standard²⁰ ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) มากกว่า 90%

ผลการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวินิจฉัยสามารถจัดวางตัวเลขเข้าในตาราง 2 x 2 ได้ทั้งนี้เพื่อใช้ในการคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ความถูกต้อง (Accuracy), Predictive values

การรับรองจริยธรรมการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการการพิจารณาโครงการวิจัย กรมแพทยทหารบก เลขรับรองที่ IRBRTA 030/2566

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษา โดยการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยวิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว เปรียบเทียบกับวิธี Real time RT-PCR ปกติ ในกลุ่มตัวอย่าง 60 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า วิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง ให้ผลพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของค่า Cycle threshold (Ct value) ของการตรวจพบยีน ORF1ab ร่วมกับยีน N คือ 18.34 ซึ่งผลการตรวจที่ได้ตรงกับวิธี Real time RT-PCR ปกติ 30 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบยีน ORF1ab ค่าเฉลี่ยของค่า Ct เท่ากับ 23.30 ยีน N ค่าเฉลี่ยของค่า Ct เท่ากับ 22.81 และยีน E ค่าเฉลี่ยของค่า Ct เท่ากับ 23.18 (ตารางที่ 2)

วิธีทดสอบ	ยีนเป้าหมาย	ค่าเฉลี่ยของ ค่า Ct	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ค่ากลางของ ค่า Ct	ค่า Ct ต่ำสุด	ค่า Ct สูงสุด
Real-time RT-PCR	ORF1ab	23.30	4.75	22.85	16.64	35.10
	N	22.81	4.57	21.65	14.73	32.21
	E	23.18	5.26	21.85	16.75	40.25
	IC	31.24	2.87	31.64	25.48	36.39
One step Real-time RT-PCR	ORF1ab ร่วมกับ N	18.34	5	17.16	11.33	30.54

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ค่ากลาง และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า Cycle threshold (Ct value) ของการตรวจพบยีนเป้าหมายด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์ Real time RT-PCR ปกติ และวิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว

จากนั้นตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง ให้ผลไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งตรงกับวิธี Real time RT-PCR ปกติ 30 ตัวอย่าง คิดเป็นความไว (sensitivity) 100% และความจำเพาะ (specificity) 100% ที่ค่าระดับความเชื่อมั่น 95% มีช่วงค่าความเชื่อมั่น (confident interval) อยู่ที่ 88.40% - 100% (ตารางที่ 3)

		Real-time RT PCR			
		ผลลบ		ผลบวก	
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
One step Real-time RT PCR	ผลลบ	30	100	0	0
	ผลบวก	0	0	30	100
	ร้อยละ	ค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 95% CI			
		ค่าร้อยละต่ำสุด	ค่าร้อยละสูงสุด		
ค่าความไว	100	88.40	100		
ค่าความจำเพาะ	100	88.40	100		
ค่าทำนายเมื่อผลเป็นบวก	100	88.40	100		
ค่าทำนายเมื่อผลเป็นลบ	100	88.40	100		

ตารางที่ 3 ตารางแสดงสถิติอนุมาน (Inferential statistics) การประมาณค่าสัดส่วนและนำเสนอช่วงความเชื่อมั่น 95% (95% confidence interval) ของความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายเมื่อผลเป็นบวก Positive Predictive Value (PPV) และ ค่าทำนายเมื่อผลเป็นลบ Negative Predictive Value (NPV) ของวิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว เปรียบเทียบกับวิธี Real time RT-PCR ปกติ

ทำการหาค่าความสัมพันธ์ (Pearson Correlation) ของผลการตรวจระหว่างวิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว เปรียบเทียบกับวิธี Real time RT-PCR ปกติ พบว่า ผลค่า Ct ของวิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว มีความสัมพันธ์กันกับ ผลค่า Ct ของวิธี Real time RT-PCR ปกติที่ตรวจพบยีน ORF1ab และ ยีน N ที่ระดับความสัมพันธ์ 0.98 อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4)

ชนิดของยีน	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างวิธีทดสอบ และวิธีมาตรฐาน	ค่านัยสำคัญ (P-value)
ORF1ab	0.98	<0.001
N	0.98	<0.001
E	0.98	<0.001
IC	0.94	<0.001

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าความสัมพันธ์ (Pearson Correlation) ของผลการตรวจระหว่างวิธี Real time RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว เปรียบเทียบกับวิธี Real time RT-PCR ปกติ

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพ ความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง และความสอดคล้องของผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 แบบขั้นตอนเดียว กับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2) ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR พบว่า เครื่องมือตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 แบบขั้นตอนเดียวให้ผลที่มีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องสูง สอดคล้องกับวิธีตรวจแบบ Real time RT-PCR ซึ่งเป็นวิธี Gold standard ในการตรวจวิเคราะห์หาการติดเชื้อของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 เครื่องมือนี้จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจและรายงานผลทางห้องปฏิบัติการได้ โดยระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจและรายงานผล ใช้เวลาประมาณ 20 นาที ซึ่งน้อยกว่าระยะเวลาการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2) ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ปกติ ซึ่งต้องมีขั้นตอนการสกัด และการเตรียมน้ำยา ประมาณ 1.5 - 2 ชั่วโมง ซึ่งผลจากการวิจัยนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยประเมินประสิทธิภาพของเครื่อง Cobas SARS-CoV-2 Test ในการตรวจวินิจฉัยโรคภายใน 48 ชั่วโมง ในช่วงการระบาดของโรคโควิด 19 ของสถาบัน Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, ประเทศสโลวาเนีย จากการทดสอบชุดตรวจขั้นตอนเดียวนี้กับวิธี in house พบว่าวิธีนี้ มีความน่าเชื่อถือได้ และเหมาะสำหรับการใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคโควิด 19 ในช่วงที่มีการระบาด⁶ เห็นได้ว่าเครื่องมือนี้สามารถลดระยะเวลาในการตรวจหาผู้ติดเชื้อ ทำให้สามารถเข้าถึงและรับการรักษาได้อย่างทันท่วงที ทั้งในกรณีปกติ และกรณีผู้ติดเชื้อที่มีอาการรุนแรงในภาวะฉุกเฉิน รวมถึงสามารถควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตามที่งานวิจัยแบบ Multicenter study จากงานวิจัยร่วมกันจากหลายหน่วยงานวิจัยของประเทศสหรัฐอเมริกา ในการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องมือ Point of care Cobas Liat ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยหาเชื้อโควิด 19 แบบขั้นตอนเดียว พบว่าเครื่องมือนี้เหมาะกับการนำมาใช้ในการตรวจหาโรคในกรณีที่มิเชื่อน้อย และนำมาประยุกต์ใช้ในการเป็นเครื่องมือในการตรวจโรคเพื่อหาข้อมูลในการวางแผนทางด้านยุทธศาสตร์การควบคุมโรคได้อีกด้วย⁷ ทั้งนี้ยังเป็นการลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน อันจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงาน เพิ่มความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ และความพึงพอใจของผู้ปฏิบัติงาน รวมถึงผู้เข้ารับบริการ ทำให้หน่วยงานสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารสามารถสนับสนุนกิจกรรมทางการแพทย์อย่างมีประสิทธิภาพให้กับกองทัพบก และประชาชนได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Advice for the public on COVID-19 – World Health Organization [Internet]. World Health Organization. 2023 [cited 2024 Dec 27]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public?adgroupsurvey=>
2. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2565 [Internet]. World Health Organization. 2022 [cited 2022 Sep 27]. Available from: <https://covid19.who.int/>
3. Department of Disease. [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation in Thailand]. Nontaburi : Ministry of Public Health; 2020. Thai.
4. The Medical Council of Thailand. Coronavirus disease (COVID-19) [Internet]. Bangkok; 2019 [cited 2024 Dec 27]. Available from: https://tmc.or.th/covid19/covid19_for_medical.php
5. Roche Diagnostics. Cobas® SARS-CoV-2 Nucleic acid test for use on the Cobas® Liat® System Document Revision 4.0 [Internet]. Branchburg: Roche Molecular Systems, Inc; 2024 [cited 2024 Dec 21]. Available from:

<https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/us/en/products/c/cobas-liat-support/sars-cov-2-cova-insert-and-quality-control-kit-insert-eua1.pdf>

6. Poljak M, Korva M, Knap Gašper N, Fujs Komloš K, Sagadin M, Uršič T, et al. Clinical Evaluation of the cobas SARS-CoV-2 Test and a Diagnostic Platform Switch during 48 Hours in the Midst of the COVID-19 Pandemic. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6):e00599-20.
7. Hansen G, Marino J, Wang ZX, Beavis KG, Rodrigo J, Labog K, et al. Clinical Performance of the Point-of-Care cobas Liat for Detection of SARS-CoV-2 in 20 Minutes: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol.* 2021;59(2):e02811-20.

