

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเตรียมความพร้อมเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV) ที่ระบาดในประเทศไทย

มิญช์ คร้ามอยู่¹

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร

บทคัดย่อ

ที่มาและความสำคัญ การเตรียมความพร้อมเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการระบาดของโรคทางเดินหายใจในประเทศไทย **วัตถุประสงค์** การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมความพร้อมเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจในผู้ติดเชื้อได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพสามารถตรวจสอบได้หลายเป้าหมายในเวลาเดียวกัน เป็นการเสริมสร้างขีดความสามารถในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร เพื่อสนับสนุนในการสืบสวนการระบาดของโรคและเตรียมความพร้อมในการรับมือกับอุบัติการณ์การระบาดของโรคทางเดินหายใจในทหารและประชาชนที่พักอาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยง และลดอัตราการสูญเสียของกำลังพลกองทัพ **วิธีการวิจัย** กระบวนการวิจัยใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคไข้หวัดใหญ่ และอาร์เอสวี ด้วยข้อมูลผลการตรวจจากวิธี Gold standard (Real-time RT-PCR) จำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจดังกล่าว 30 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้นจำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาดำเนินการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ ด้วยชุดน้ำยา FDTTM Respiratory pathogens 21 ร่วมกับการควบคุมคุณภาพด้วย Positive Control และ Negative Control เปรียบเทียบผลการตรวจกับผลการตรวจแบบ Real-time RT-PCR ปกติ **ผลการวิจัย** ผลการศึกษาจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และอาร์เอสวี ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR ที่เตรียมขึ้น ให้ผลตรงกับผลการตรวจจากวิธี Real-time RT-PCR ทั้ง 60 ตัวอย่าง **สรุปและวิจารณ์ผล** แสดงให้เห็นว่าการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และอาร์เอสวี ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR ที่พัฒนาในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร สามารถตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจในสิ่งตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีเชื่อถือได้ ลดระยะเวลาในการปฏิบัติงานการสอบสวนโรคติดเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ มีความพร้อมในการรับมือกับอุบัติการณ์การระบาดของโรค ซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการควบคุมอุบัติการณ์การระบาดของโรค สนับสนุนและให้ความร่วมมือแผนงานทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ ● Multiplex Real-time RT-PCR ● เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ● เชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV)
● การตรวจวินิจฉัย ● การระบาด

เวชสารแพทย์ทหารบก. 2568;78(2):75-84.

ได้รับต้นฉบับ 20 มีนาคม 2568 แก้ไขบทความ 26 พฤษภาคม 2568 รับลงตีพิมพ์ 09 มิถุนายน 2568

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ มิญช์ คร้ามอยู่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร Steadfast.minzo@gmail.com Tel.085-849-9593

Original article

Preparation of Multiplex Real-time RT-PCR for diagnosis of Influenza virus and Human respiratory syncytial viruses (RSV) spreading in Thailand

Min kramyoo¹

¹Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand

Abstract

Background The preparation of the Multiplex Real-time RT-PCR technique is crucial for the diagnosis of influenza virus and Respiratory Syncytial Virus (RSV), both of which play significant roles in respiratory disease outbreaks in Thailand. **Objective** This study aimed to prepare the technique for diagnosing respiratory viral infections, allowing for the simultaneous detection of multiple targets. It enhances the diagnostic capabilities of AFRIMS to support outbreak investigations and promptly address respiratory disease outbreaks in both military personnel and civilians in high-risk areas, ultimately reducing the loss of army personnel. **Method** The research process involved using RNA samples to detect the genetic material of influenza and RSV viruses, with results compared to those from the Gold Standard (real-time RT-PCR) method using 30 positive and 30 negative samples, totaling 60 samples. These were tested for respiratory pathogen genetic material using the FDTM Respiratory Pathogens 21 reagent kit, alongside quality controls with positive and negative controls. The results were then compared to those from standard real-time RT-PCR testing. **Result** The results showed that the Multiplex real-time RT-PCR technique developed provided results consistent with those from the standard real-time RT-PCR for all 60 samples. **Conclusion / Discussion** This indicates that the developed Multiplex real-time RT-PCR technique at the Virology Laboratory of AFRIMS can accurately and reliably diagnose respiratory viral infections. This technique reduces the time required for investigating respiratory viral infections and prepares for handling disease outbreak incidents, thus improving the capability to control outbreaks and supporting future public health plans in Thailand.

Keywords ● Multiplex Real-time RT-PCR ● influenza virus ● RSV ● diagnosis ● endemic

RTA Med J. 2025;78(2):75-84.

Received 20 March 2025 Corrected 26 May 2025 Accepted 09 June 2025

Correspondence should be addressed to Author: Min Kramyoo Armed Forces Research Institute of Medical Sciences E-mail: Steadfast.minzo@gmail.com Tel. 085-849-9593

บทนำ

โรคติดต่อทางเดินหายใจเป็นโรคที่เป็นภัยสุขภาพที่เกิดขึ้นในช่วงฤดูฝนของประเทศไทย ประกาศกรมควบคุมโรค วันที่ 8 มิถุนายน 2566 ที่ผ่านมา ได้ประกาศโรคติดต่อทางระบบหายใจที่เป็นภัยสุขภาพของฤดูกาลนี้โดยเฉพาะ ได้แก่ โรคไข้หวัดใหญ่ และโรคปอดอักเสบ¹ ไข้หวัดใหญ่เป็นโรคติดต่อทางระบบหายใจอันดับหนึ่งที่ทางกรมควบคุมโรค ประกาศให้เป็นภัยสุขภาพในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาวในปีที่ผ่านมา^{1,2} การรายงานสถานการณ์เฝ้าระวังโรคไข้หวัดใหญ่ ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม – 24 มิถุนายน 2566 มีรายงานผู้ป่วย 59,470 ราย อัตราป่วยร้อยละ 89.93 ต่อประชากรแสนคน มีรายงานผู้เสียชีวิต 1 ราย ในจังหวัดสงขลา อัตราป่วยตายร้อยละ 0.002 ต่อประชากรแสนคน สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A/H1N1 ซึ่งอัตราการป่วยสูงกว่าค่ามัธยฐาน 5 ปีย้อนหลังในช่วงเวลาเดียวกันที่ผ่านมา การกระจายตัวของกลุ่มโรคไข้หวัดใหญ่พบเหตุการณ์พบผู้ป่วยอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่เป็นกลุ่มก้อนแยกเป็นรายเดือนตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2566 – 24 มิถุนายน 2566 พบว่าสถานที่ที่พบผู้ป่วยมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ โรงเรียน เรือนจำ และค่ายทหาร

เชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่าง สามารถเกิดการติดเชื้อได้ในทุกกลุ่มอายุ ข้อมูลการเฝ้าระวังโรคไข้หวัดใหญ่และโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจจากการเฝ้าระวังเฉพาะพื้นที่ กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม – 2 กันยายน 2566 พบผู้ป่วยติดเชื้อ RSV 270 ราย จากจำนวนตัวอย่างส่งตรวจ 5,110 ราย ในจำนวนนี้มี 18 ราย ต้องเข้ารักษาในแผนกผู้ป่วยหนัก (ICU) (ร้อยละ 9.09) สำหรับผู้เสียชีวิตพบเป็นผู้ป่วยอายุ 86 ปี มีโรคประจำตัว ได้แก่ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และไขมันในเลือดสูง ข้อมูลจากการเฝ้าระวังพบว่าเชื้อ RSV มักจะเป็นสาเหตุของการเกิดปอดอักเสบรุนแรงในเด็กและผู้สูงอายุ สำหรับประเทศไทยมักพบเชื้อไวรัส RSV ได้บ่อยในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว ซึ่งเป็นช่วงเวลาใกล้เคียงกับฤดูกาลระบาดของไข้หวัดใหญ่ไวรัสจะมีชีวิตอยู่ภายนอกร่างกายได้เป็นเวลาหลายชั่วโมงโดยอาศัยอยู่ตามวัตถุต่างๆ และแพร่กระจายได้ง่ายผ่านการไอ หรือการจาม ซึ่งจากการเฝ้าระวังพบว่า ปัจจุบันการตรวจพบเชื้อ RSV มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันกับจำนวนผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่³

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยันโรคไวรัสทางเดินหายใจ โดยวิธี Real-time PCR เป็นวิธีที่ทางองค์การอนามัยโลกแนะนำในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และโรคติดเชื้อทางเดินหายใจอื่น ๆ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่างที่มีจำนวนน้อยได้⁴ แต่การใช้ Multiplex Real-time RT-PCR สามารถตรวจหาหลายเชื้อได้ในคราวเดียวกันใน 1 รอบการตรวจ ทำให้สามารถได้รับผลตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว แม่นยำ และทันต่อการรักษา ทางผู้วิจัยจึงจัดทำโครงการพัฒนาเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสอาร์เอสวีให้กับผู้ที่มีอาการน่าสงสัยในการติดเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ เพื่อสนับสนุนทีมเฝ้าระวังโรคที่เป็นอุปสรรคในทหารของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารในการติดตามเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของโรค รวมถึงงานบริการให้กับทหารและประชาชนได้อย่างมีประสิทธิภาพและทันต่อเหตุการณ์ต่อไป

ไข้หวัดใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่ก่อโรคในคนแบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ เชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A B และ C⁵ อุบัติการณ์ของโรคไข้หวัดใหญ่ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A และสายพันธุ์ B ส่วนเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ C มักก่อให้เกิดอาการไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดการระบาดของอาการที่พบในผู้ป่วยมักมีอาการไอสูงเฉียบพลัน 38 - 40 องศาเซลเซียส หนาวสั่น ปวดศีรษะปวดเมื่อย กล้ามเนื้อ อ่อนเพลียมาก ไอแห้ง ๆ คอแห้ง เจ็บคอ อาจมีอาการคัดจมูก น้ำมูกไหล จาม หรือมีเสมหะมาก ตาแดง ตาแฉะ ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการปฏิบัติหน้าที่เป็นอย่างมาก การติดต่อสามารถติดต่อได้ทาง การหายใจ โดยจะได้รับเชื้อที่ออกมาปนเปื้อนอยู่ในอากาศเมื่อผู้ป่วยไอ จาม หรือพูด ในพื้นที่ที่มีคนอยู่รวมกันหนาแน่น เช่น ในค่ายทหาร โรงเรียน โรงงาน เป็นต้น หรือติดต่อผ่านการสัมผัสผิวย่อยละองน้ำมูก น้ำลายของผู้ป่วย (droplet transmission) จากมือที่สัมผัสกับพื้นผิวที่มีเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ แล้วใช้มือสัมผัสที่จมูกและปาก⁶

เวชสารแพทย์ทหารบก ปีที่ 78 ฉบับที่ 2 เมษายน-มิถุนายน 2568

ผลการเฝ้าระวังเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในผู้ป่วยกลุ่มอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ และกลุ่มอาการปอดบวมจากโรงพยาบาลเครือข่ายของกรมควบคุมโรค ร่วมกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม-24 มิถุนายน 2566 พบการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A สายพันธุ์ย่อย H1N1/2009 เพิ่มมากขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 25 (ระหว่างวันที่ 18 มิถุนายน-24 มิถุนายน 2566) โดยตรวจพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A สายพันธุ์ย่อย H1N1/2009 ร้อยละ 50 ของตัวอย่างผู้ป่วยส่งตรวจจากโรงพยาบาลเครือข่าย⁷

โรคไข้หวัดเป็นโรคที่เกิดได้ตลอดทั้งปี พบบ่อยในช่วงฤดูฝน ฤดูหนาว หรือช่วงที่อากาศเปลี่ยนแปลง ไข้หวัดเกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งมีหลายสายพันธุ์ เมื่อป่วยเป็นไข้หวัดแต่ละครั้งมักเกิดจากเชื้อไวรัสหวัดเพียงชนิดเดียว และเมื่อหายแล้วร่างกายก็จะมีภูมิต้านทานต่อเชื้อชนิดนั้น การติดต่อ เชื้อไวรัสไข้หวัดที่อยู่ในน้ำมูก น้ำลาย และเสมหะติดต่อโดยการไอ หรือหายใจรดกัน หรือจากการสัมผัส เมื่อมีเชื้อหวัดติดที่มือแล้วไปสัมผัสผู้อื่น เชื้อหวัดก็จะติดคนๆ นั้น และเมื่อนำไปขยี้ตาหรือแคะจมูกก็จะเข้าสู่ร่างกายจนกลายเป็นไข้หวัดได้⁸

โรคติดเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจจากเชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV) เกิดจากเชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่าง สามารถเกิดการติดเชื้อได้ในทุกกลุ่มอายุ แต่อาการจะรุนแรงในเด็กเล็ก เด็กที่คลอดก่อนกำหนด และผู้สูงอายุ มากกว่า 65 ปี รวมถึงผู้ที่มีโรคประจำตัวเรื้อรัง เช่น เบาหวาน โรคปอด โรคหัวใจ หรือมีปัญหเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันร่างกายผิดปกติ เป็นต้น⁹

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจด้วยชุดตรวจเร่งด่วน (Rapid test) มีการใช้อยู่ทั่วไปเนื่องจากง่ายและมีราคาถูก แต่มักมีค่าความไวต่ำ โดยมีค่าความแปรปรวนของความไวอยู่ที่ 50%-90% ผลจากการตรวจด้วยชุดตรวจเร่งด่วนไม่สามารถยืนยันการไม่ติดเชื้อได้¹⁰ โดยประสิทธิภาพชุดตรวจเร่งด่วนจะขึ้นอยู่กับลักษณะของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจที่มีการระบาดอยู่ ณ ขณะนั้น¹¹ นอกจากนี้ ชุดตรวจเร่งด่วน มักมีความไวขึ้นอยู่กับยี่ห้อและคุณภาพ โดยความไวจะ สูงขึ้นในช่วงที่มีปริมาณไวรัสมาก เช่น ช่วง 1-7 วันแรกของการมีอาการ ความไวลดลงมากในผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการหรืออยู่ในช่วงท้ายของการติดเชื้อ¹² ในขณะที่ความจำเพาะสูงถึง 98.9%¹³ ชุดตรวจบางประเภท (เช่น multiplex rapid tests) สามารถตรวจได้ทั้ง SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV พร้อมกัน แต่เฉลี่ยราคาสูงกว่า 3-5 เท่า เมื่อเทียบกับชุด ATK ทั่วไป โดยบางชุดอาจมีความไวในการตรวจหา SARS-CoV-2 สูง แต่ต่ำกว่าสำหรับ Influenza หรือ RSV¹⁴ ทั้งนี้ การเก็บตัวอย่างที่ไม่ถูกต้อง อาจส่งผลต่อความไวของชุดตรวจเร่งด่วน¹⁵

ห้องปฏิบัติการจึงได้นำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัด เนื่องจากการเพิ่มความไว และความจำเพาะในการตรวจ¹⁶

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อเตรียมความพร้อมเทคนิค Multiplex Real-time PT-PCR สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจในผู้ติดเชื้อได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เป็นเสริมสร้างขีดความสามารถในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร และสนับสนุนในการสืบสวนการระบาดของโรคทางเดินหายใจ และเตรียมความพร้อมในการรับมือกับอุบัติการณ์การระบาดของโรคทางเดินหายใจในทหารและประชาชนที่พักอาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยง และลดอัตราการสูญเสียของกำลังพล

รูปแบบการศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงปฏิบัติการ ใช้ในการทดลองการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ด้วยวิธี multiplex Real time RT-PCR ให้ได้ผลอย่างถูกต้องแม่นยำ โดยเปรียบเทียบผลการตรวจกับ ผลการตรวจแบบ Real-time RT-PCR ปกติ โครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาทางด้านจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย กรมแพทย์ทหารบกได้ทบทวนโครงการวิจัย รหัสโครงการ: S042b/67_Xmp

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างหรือประชากรที่ทำการศึกษา

ทำการคัดเลือกตัวอย่างที่เหลือที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจด้วยข้อมูลผลการตรวจจากวิธี Gold standard (Real-time RT-PCR) ที่เก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับส่งตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา จำนวน 30 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ จำนวน 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เป็นตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา แผนกจุลชีววิทยา กองวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ที่ได้รับการอนุญาตให้นำมาใช้ โดยหลอดตัวอย่างมีเฉพาะ เลขรหัสตัวอย่าง ไม่มีข้อมูลใด ๆ ที่สามารถเชื่อมโยงกลับไปยังชื่อ หรือระบุตัวบุคคลเจ้าของตัวอย่างได้โดยตรงหรือโดยอ้อมได้เลย กำหนดขนาดของกลุ่มตัวอย่างเพื่อให้เข้าเกณฑ์ขั้นต่ำกรณีไม่ทราบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มประชากร การเลือกกลุ่มตัวอย่างเป็นการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive sampling) เป็นการเลือกกลุ่มตัวอย่างโดยพิจารณาจากการข้อมูลผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาที่มีเฉพาะเลขรหัสของตัวอย่าง ลักษณะของกลุ่มที่เลือกเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ ด้วยชุดน้ำยา FDTM Respiratory pathogens 21 ขั้นตอนการตรวจมีดังนี้

สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างด้วยชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปยี่ห้อ BEAVERbeads™ Viral DNA/RNA Kit ที่ใช้งานกับระบบสกัดแบบอัตโนมัติหลักการ magnetic beads-based ในการสกัดแยกสารพันธุกรรมของอาร์เอ็นเอไวรัสจากตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ (VTM) สกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจที่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรสารพันธุกรรมสุดท้าย (Elution volume) มีปริมาตรประมาณ 100 ไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยชุดน้ำยา FDTM Respiratory pathogens 21 ใช้หลักการเพิ่มปริมาณ RNA เป้าหมายที่จำเพาะเจาะจง ด้วยเทคนิค Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ในขั้นตอนเดียว ชุดน้ำยาสามารถตรวจวิเคราะห์หาลำดับเป้าหมายของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A (IAV) เชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ B (IBV) และ เชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV) จำนวน 3 เชื้อ ได้พร้อมกันในหลอดเดียวกัน

ชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย

- | | |
|------------------------------------|--------------|
| 1. น้ำยา FluRhino Primer/Probe Mix | จำนวน 1 หลอด |
| 2. Resp21 positive control | จำนวน 1 หลอด |
| 3. Nuclease free water | จำนวน 1 หลอด |
| 4. Internal Control | จำนวน 1 หลอด |
| 5. 25x RT-PCR Enzymes | จำนวน 1 หลอด |
| 6. 2x RT-PCR buffer | จำนวน 1 หลอด |

เตรียมน้ำยาตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 ปริมาณการเตรียมน้ำยา Master mix สำหรับ 1, 9, 32, และ 64 reactions

Number of Reactions	1	9	32	64
2x RT PCR Buffer	12.5 ul	112.5 ul	400 ul	800 ul
Primer/Probe Mix	1.5 ul	13.5 ul	48 ul	96 ul
25xRT PCR Enzyme	1 ul	9 ul	32 ul	64 ul
Total	15 ul	135 ul	480 ul	960 ul

เตรียมออกแบบการลงตัวอย่างใน 96 well plate set up

ตั้งค่า โปรแกรมในเครื่อง Thermocycler เพื่อตั้งค่า Detector และ ปฏิกริยา PCR ในการทำปฏิกริยา Real time PCR ตามตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 การตั้งค่า Detector

PP Mix and Thermocycler Detection Settings							
	Master Mix					Dye	Detection Wavelength (nm) ^[a]
	FluRhino	COR	ParaEAV	BoMpPf1	RsEPA		
Pathogen	IAV	HCoV229E	HPIV-3	HPIV-1	HRSV A and B	green	520
	HRV	HCoV NL63	HPIV-2	HMPV A and B	HPeV	yellow	550
	IBV	HCoV HKU1	HPIV-4	HBoV	EV	orange	610
	IAV(H1N1) swl	HCoV OC43	IC(EAV)	M. pneumoniae	HAdV	red	670

[a] Detection wavelengths listed are from the Applied Biosystems 7500. Wavelengths may vary for other thermocyclers.

ตารางที่ 3 การตั้งค่า Thermocycler ในการตรวจ Real time PCR

Stage	Cycles	Acquisition	Temperature	Time
Hold	/	/	50°C	15 minutes
Hold	/	/	94°C	1 minutes
Cycling	40	/	94°C	8 seconds
		yes	60°C	1 minutes

มี RNase P เป็น Internal Control สำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างทดสอบ, การสกัดสารพันธุกรรม และขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ชุดน้ำยาต้องมีการควบคุมคุณภาพในแต่ละรอบรัน ประกอบด้วย Positive Control, Negative Control และ Internal control เพื่อใช้ติดตามว่าเทคนิคถูกต้อง โดยค่า Ct ของ Positive control ควรต่ำกว่า 33 และทุกตัวอย่าง รวมถึง Negative control ต้องมีค่า Ct ของ Internal control ต่ำกว่า 33

การแปลผล ผลบวกในการพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสแต่ละเชื้อจะปรากฏสัญญาณสีตามการตั้งค่าของ Detector เมื่อปรากฏสัญญาณสีเขียว หมายถึง ตัวอย่างตรวจพบสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัส Influenza A และไม่มี หรือไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดอื่น

เมื่อปรากฏสัญญาณสีเขียว และสีแดง หมายถึง ตัวอย่างตรวจพบสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัส Influenza A (H1N1) swl และไม่มี หรือไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดอื่น

เมื่อปรากฏสัญญาณสีเหลือง หมายถึง ตัวอย่างตรวจพบสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัส Rhinovirus และไม่มี หรือไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดอื่น

เมื่อปรากฏสัญญาณสีส้ม หมายถึง ตัวอย่างตรวจพบสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัส Influenza B และไม่มี หรือไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดอื่น ตามตารางที่ 4 พร้อมกับค่า Cycle threshold (Ct)

ตารางที่ 4 ตารางแสดงผลบวกเมื่อปรากฏสัญญาณสีจำเพาะกับชนิดของเชื้อ

PP Mix	Pathogen	Signal in Green Channel	Signal in Yellow Channel	Signal in Orange Channel	Signal in Red Channel
FluRhino	IAV	POS	–	–	–
FluRhino	HRV	–	POS	–	–
FluRhino	IBV	–	–	POS	–
FluRhino	IAV (H1N1) swl	POS	–	–	POS

เมื่อไม่พบสัญญาณสีใด ๆ หมายถึงเชื้อไวรัสตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ

Limit of Detection ของชุดตรวจ

Influenza A (FluA), Human Parainfluenza Virus 2 (HPIV-2), Human Metapneumovirus (HMPV), Human Coronavirus OC43 (HCoV OC43): $\sim 10^2$ copies/mL

Influenza B (FluB), Human Coronavirus HKU1 (HCoV HKU1), Human Parainfluenza Virus 1 (HPIV-1), Human Bocavirus (HBoV), Human Parainfluenza Virus 3 (HPIV-3), Human Coronavirus NL63 (HCoV NL63), Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human Adenovirus (HAdV), Enterovirus (EV), Human Parechovirus (HPeV): $\sim 10^3$ copies/mL

Human Rhinovirus (HRV), Human Coronavirus 229E (HCoV 229E), Human Parainfluenza Virus 4 (HPIV-4): $\sim 10^4$ copies/mL¹⁷

การวัดผลการวิจัย

ผลการวิจัยที่ต้องการคือ ผลจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ ด้วยชุดน้ำยา FDTTM Respiratory pathogens 21 เป็นชุดตรวจที่ใช้กับเครื่องตรวจ Real-time PT-PCR ให้ผลบวกตรงตามมาตรฐานการควบคุมของชุดน้ำยา และตรงกับผลอ้างอิงของตัวอย่างจากวิธี Real-time PT-PCR

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

เก็บรวบรวมข้อมูลผลการทดลองเป็นอิเล็กทรอนิกส์ไฟล์ นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ค่า Ct ด้วย paired samples t-test ที่ความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

การรับรองจริยธรรมการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย กรมแพทยทหารบก เลขรับรองที่ IRBRTA 656/2567

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และเชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV) ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR ในกลุ่มตัวอย่าง 60 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ ไข้หวัดใหญ่ และเชื้อไวรัสอาร์เอสวี ด้วยข้อมูลผลการตรวจจากวิธี Gold standard (Real-time RT-PCR) ที่เก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับส่งตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา จำนวน 30 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า เทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR ให้ผลพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ 30 ตัวอย่าง ตรงกับวิธี Real-time RT-PCR 30 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจ 30 ตัวอย่าง ในตัวอย่างที่มีผล Real-time RT PCR ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจตรงทั้ง 30 ตัวอย่าง

คิดเป็นความไว (sensitivity) 100% และความจำเพาะ (specificity) 100% ที่ค่าระดับความเชื่อมั่น 95% มีช่วงค่าความเชื่อมั่น (confident interval) อยู่ที่ 88.40% - 100% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 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

		Real-time RT PCR (Gold standard)			
		Positive		Negative	
		n	%	n	%
Multiplex Real time PCR	Positive	30	100	0	0
	Negative	0	0	30	100
		Value	95%CI		
			lower	upper	
Sensitivity		100.00%	88.40%	100.00%	
Specificity		100.00%	88.40%	100.00%	
Positive predictive value		100.00%	88.40%	100.00%	
Negative predictive value		100.00%	88.40%	100.00%	

อภิปรายผลการวิจัย

การเตรียมความพร้อมเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และเชื้อไวรัสอาร์เอสวี (RSV) ณ ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กองวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ได้มีการจัดเตรียมทางด้านเทคนิคให้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ โดยผลที่ได้ตรงกับผลของวิธีมาตรฐาน Real time RT-PCR ที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ ในการศึกษาหนึ่งพบว่า ชุดตรวจ FTD RP21 สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในตัวอย่างได้ในอัตรา 73.6% ซึ่งใกล้เคียงกับการทดสอบแบบ custom multiplex RT-PCR ที่มีอัตราการตรวจพบ 75.3% โดยมีความสอดคล้องกันสูงถึง 94.7–100% ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่ตรวจหา¹⁸ โดยต้นทุนต่อการทดสอบ พบการศึกษาหนึ่งระบุว่าต้นทุนต่อการทดสอบด้วยชุดตรวจ FTD RP21 มีราคาอยู่ที่ประมาณ \$42.66 ต่อครั้ง ซึ่งสูงกว่าวิธีการทดสอบแบบ singleplex ของ CDC ที่มีต้นทุนประมาณ \$26.83 ต่อชิ้นงาน แต่ถึงแม้ว่าใน 1 ครั้งของชุดตรวจแบบ Multiplex จะมีราคาที่สูง แต่ใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าวิธีการทดสอบแบบ singleplex เนื่องจากสามารถตรวจหาเชื้อหลายชนิดได้พร้อมกันในครั้งเดียว การเปรียบเทียบขั้นตอนการทดสอบและการแปลผลระหว่างชุดตรวจ FTD™ Respiratory Pathogens 21 (FTD RP21) กับวิธี Real-time RT-PCR แบบทั่วไป พบว่าทั้งสองวิธีใช้หลักการ real-time RT-PCR เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างในด้านความสะดวก ความซับซ้อน และความสามารถในการวิเคราะห์ผล โดยชุดตรวจ FTD RP21 มีจุดเด่นที่สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสและแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจได้ถึง 21 ชนิดในการตั้งปฏิกิริยาเดียว (multiplex RT-PCR) ซึ่งช่วยลดเวลาในการทดสอบและความผิดพลาดจากการเปิดหลายครั้ง อีกทั้งยังมีการจัดเตรียม

master mix, primer และ probe มาให้ครบถ้วนในชุดสำเร็จรูป ทำให้ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการรันเครื่องมีความรวดเร็วและลดภาระงานของผู้ปฏิบัติ¹⁹ ในขณะที่วิธี Real-time RT-PCR แบบทั่วไป ผู้ทดสอบต้องเตรียมปฏิกิริยาแยกต่างหากสำหรับแต่ละเชื้อที่ต้องการตรวจ ซึ่งอาจเป็นแบบ singleplex หรือ multiplex เล็ก ๆ เช่น 2-3 ชนิดต่อหนึ่ง reaction โดยต้องออกแบบ primer/probe เองหรือตามคู่มือที่เผยแพร่โดยองค์กรต่าง ๆ เช่น CDC หรือ WHO²⁰ ทำให้การดำเนินการมีความซับซ้อนและต้องใช้เวลามากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีการตรวจเชื้อหลายชนิด นอกจากนี้ การแปลผลของวิธี RT-PCR ทั่วไปยังต้องอาศัยการอ่านค่า Ct (cycle threshold) ด้วยตนเอง ซึ่งต้องพิจารณาร่วมกับเกณฑ์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ FTD RP21 จะใช้ซอฟต์แวร์วิเคราะห์ผลแบบอัตโนมัติ และแสดงผลเชิงคุณภาพว่า “Detected” หรือ “Not detected” โดยมี internal control ในทุกตัวอย่างเพื่อรับประกันคุณภาพของผลทดสอบ²¹ การศึกษานี้มีการใช้ตัวอย่าง 60 ราย ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการสรุปผลทั่วไป ความครอบคลุมของเชื้อที่พบสามารถตรวจหาเชื้อที่อยู่ในชุดตรวจ FTD RP21 ซึ่งครอบคลุมเชื้อไวรัสและแบคทีเรียที่พบบ่อย แต่ไม่สามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่ไม่รวมอยู่ในชุดตรวจได้ หากมีการระบาดของเชื้อก่อโรคชนิดใหม่ เช่น SARS-CoV-2 จำเป็นต้องพัฒนาชุดตรวจใหม่หรือปรับปรุงชุดตรวจเดิมให้สามารถตรวจหาเชื้อดังกล่าวได้ โดยสรุป ชุดตรวจ FTD RP21 เหมาะสำหรับการตรวจเชื้อก่อโรกระบบทางเดินหายใจแบบครบวงจรในเวลาจำกัด โดยให้ความสะดวกในการเตรียมและแปลผล ส่วน Real-time RT-PCR แบบทั่วไปเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการความยืดหยุ่นสูงในการเลือกชนิดเชื้อและควบคุมต้นทุนในระยะยาว ทั้งนี้ ควรเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ทางคลินิกและทรัพยากรที่มีผลการศึกษาพบว่า เทคนิคนี้มีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้จริง โดยผลเบื้องต้นแสดงให้เห็นถึงความไวและความจำเพาะในระดับที่น่าพึงพอใจ สะท้อนถึงศักยภาพในการขยายผลสู่การใช้งานภาคสนามในวงกว้าง ทั้งนี้ควรมีการทดสอบเพิ่มเติมในประชากรหลากหลายกลุ่มเพื่อยืนยันความสม่ำเสมอของผลลัพธ์ ด้วยความพร้อมที่มี ทั้งทางด้านสถานที่ห้องปฏิบัติการทางอนุชีววิทยา อุปกรณ์เครื่องมือที่ทันสมัย และบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในการปฏิบัติงาน ทำให้สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารมีความพร้อมในการรับมือกับสถานการณ์การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่และโรคติดเชื้อไวรัสอาร์เอสวีในกำลังพลทหาร และสนับสนุนให้ความร่วมมือทางด้านนโยบายแก่กระทรวงสาธารณสุขได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. Department of Disease Control. [Prevention of diseases and health hazards during the rainy season.] Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2017. Thai.
2. Department of Disease Control. [Prevention of diseases and health hazards during the winter season in Thailand.] Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2017. Thai.
3. Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control. [Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection]. Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2023. Thai.
4. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus in humans update. Geneva: World Health Organization; 2011.
5. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, eds. Field's virology. Vol 2, DNA Viruses. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2007. P.1647-89.
6. Department of Disease Control (Thailand). Influenza A (Influenza) [Internet]. Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2017 [cited 2025 Jun 5]. Available from: https://ddc.moph.go.th/disease_detail.php?d=20
7. Communicable Disease Epidemiology Group, Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control. Influenza situation report in Thailand, 2023: Week 22 (May 28–June 3, 2023) [Internet]. Nonthaburi: Department of Disease Control; 2023 [cited 2025 Jun 10]. Available from: https://ddc.moph.go.th/uploads/ckeditor2/files/DOE_flu_22.2566.pdf

8. Pediatric Infectious Disease Society of Thailand. [Winter-related illnesses Part 1: Common cold and influenza]. [Internet]. 2023 [cited 2023 Jul 17]. Available from: <https://www.pidst.or.th/A289.html>
9. Jain H, Schweitzer JW, Justice NA. Respiratory Syncytial Virus Infection. [Updated 2023 Jun 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459215/>
10. 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.
11. Cruz AT, Demmler-Harrison GJ, Caviness AC, Buffone GJ, Revell PA. Performance of a rapid influenza test in children during the H1N1 2009 influenza a outbreak. *Pediatrics.* 2010 ;125(3):e645-50.
12. Linares M, Pérez-Tanoira R, Carrero A, Romanyk J, Pérez-García F, Gómez-Herruz P, et al. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms. *J Clin Virol.* 2020;133:104659.
13. Brümmer LE, Katzenschlager S, Gaedert M, Erdmann C, Schmitz S, Bota M, et al. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2021;18(8):e1003735.
14. Geris JM, Spector LG, Roesler M, Hernandez-Alvarado N, Blackstad M, Nelson HH, et al. High prevalence of asymptomatic CMV shedding in healthy children attending the minnesota state fair. *J Clin Virol.* 2022;148:105102.
15. Scohy A, Anantharajah A, Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol.* 2020;129:104455.
16. Chartrand C, Tremblay N, Renaud C, Papenburg J. Diagnostic Accuracy of Rapid Antigen Detection Tests for Respiratory Syncytial Virus Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2015;53(12):3738-49.
17. Malhotra B, Swamy MA, Reddy PV, Kumar N, Tiwari JK. Evaluation of custom multiplex real - time RT - PCR in comparison to fast - track diagnostics respiratory 21 pathogens kit for detection of multiple respiratory viruses. *Virol J.* 2016;13:91.
18. Kenmoe S, Tcharnwa C, Monamele GC, Kengne CN, Ripa MN, Whitaker B, et al. Comparison of FTD® respiratory pathogens 33 and a singleplex CDC assay for the detection of respiratory viruses: A study from Cameroon. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;94(3):236-42.
19. Sakthivel SK, Whitaker B, Lu X, Oliveira DB, Stockman LJ, Kamili S, et al. Comparison of fast-track diagnostics respiratory pathogens multiplex real-time RT-PCR assay with in-house singleplex assays for comprehensive detection of human respiratory viruses. *J Virol Methods.* 2012;185(2):259-66.
20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2020.
21. Fast Track Diagnostics. FTD™ Respiratory Pathogens 21 – Instructions for Use. Rev. B. Esch-sur-Alzette: Fast Track Diagnostics Luxembourg S.à.r.l.; 2019.