

ความสอดคล้องของผลการตรวจระหว่างชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit และ Allplex™ 2019-nCoV assay สำหรับการตรวจหาการติดเชื้อ SARS-CoV-2

ศรสิทธิ์ จีรังดา¹, ชัญชนก ประชากุล², อภิษฎา กฤษณสุวรรณ², ศุภรัตน์ ไบสูงเนิน² และ เกรียงไกร ไทยตระกูล²

¹ กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 4 จังหวัดสระบุรี

² กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสระบุรี จังหวัดสระบุรี

Received: 2nd Oct 2023

Revised: 13th Nov 2023

Accepted: 14th Dec 2023

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยชุดน้ำยาทดสอบ Allplex™ 2019-nCoV assay จำเป็นต้องมีขั้นตอนการสกัด RNA ในกระบวนการทดสอบมาตรฐานที่ให้บริการในปัจจุบัน เพื่อให้ได้วิธีการตรวจที่สะดวกและประหยัดเวลา ดังนั้น การศึกษานี้จึงใช้ชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit ซึ่งเป็นชุดน้ำยาที่สามารถใส่ตัวอย่างตรวจลงในน้ำยาตรวจได้โดยตรง ไม่ต้องมีขั้นตอนสกัด RNA และเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR ที่ได้จากทั้ง 2 ชุดน้ำยา ตรวจตัวอย่าง nasopharyngeal และ throat swab จำนวน 73 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างบวก 28 ตัวอย่าง ตัวอย่างลบ 45 ตัวอย่าง พบความสอดคล้องของผลตรวจระหว่างน้ำยาทั้ง 2 ร้อยละ 90.4 (66/73) ผลไม่สอดคล้องร้อยละ 9.6 (7/73) โดยชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit เป็นความสอดคล้องผลบวกร้อยละ 75.0 และความสอดคล้องผลลบร้อยละ 100.0 เมื่อเทียบกับน้ำยา Allplex™ 2019-nCoV assay นอกจากนี้ในตัวอย่างที่มีค่า cycle threshold (Ct) > 25 ความสอดคล้องผลบวกของชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit ลดลงเหลือร้อยละ 68.4 โดยที่ค่า Ct ของยีน N จากชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit จะให้ค่า Ct สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.012$) การใช้ชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit ในการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 อาจใช้แทนน้ำยาเดิมในกรณีตัวอย่างมีค่า Ct < 25 เนื่องจากสะดวกและลดระยะเวลาทดสอบ แต่ทั้งนี้ควรตรวจซ้ำในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลลบและในผู้ป่วยที่มีอาการ

คำสำคัญ: SARS-CoV-2, COVID-19, real-time RT-PCR, Allplex™ 2019-nCoV assay, CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit

ผู้นิพนธ์ประสานงาน: ดร.ทพ.ศรสิทธิ์ จีรังดา

กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 4 จังหวัดสระบุรี

โทร 0 3626 6006 ต่อ 305

อีเมล: sornsithjirungda@gmail.com



The results agreement between the CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit and the Allplex™ 2019-nCoV assay for the detection of SARS-CoV-2 infection

Somsith Jirungada¹, Tunchanok Prachakul², Apisada Kitsanasuwan², Suparat Baisungnuen², Kreangkrai Thaitrakull²

¹ Department of Disease Control Medical Laboratory, Office of Disease Prevention and Control, Regional 4 Saraburi

² Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Saraburi Hospital, Saraburi

Abstract

The detection of SARS CoV-2 utilizing the Allplex™ 2019-nCoV assay includes RNA extraction steps. A standard RNA extraction is used in the Allplex™ 2019-nCoV assay. The results of the Allplex™ 2019-nCoV assay and the CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit, which use direct specimens in nasopharyngeal and throat swabs, were compared in this study. Seventy-three patient samples were collected, including 28 positive and 45 negative samples. The concordance rate between both tests was 90.4% (66/73) and the inconsistency rate was 9.6% (7/73). The positive correlation was 75.0%, while the negative correlation was 100%. Furthermore, the CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit's correlation in positive samples with cycle threshold (Ct) > 25 was reduced to 68.4%. The CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit showed significantly higher Ct values for the *N* gene than the Allplex™ 2019-nCoV assay ($p = 0.012$). These findings imply that the CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit could be used to replace the prior reagent kit in the case of positive samples with Ct < 25 since it is more convenient and reduces turnaround time. If the CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit shows negative results, the procedure must be redone.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, real-time RT-PCR, Allplex™ 2019-nCoV assay, CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit

Corresponding author: Sornsith Jirungda, MT., PhD., Department of Disease Control Medical Laboratory, Office of Disease Prevention and Control, Regional 4 Saraburi

Tel. 0 3626 606 ext. 305

E-mail: sornsithjirungda@gmail.com

บทนำ (Introduction)

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus Disease 2019; COVID-19) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2) พบการระบาดครั้งแรกช่วงปลายเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 ที่เมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ สาธารณรัฐประชาชนจีน¹ และเกิดการระบาดไปทั่วโลกอย่างรวดเร็ว การระบาดของ COVID-19 ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมในระดับโลก ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่คาดว่าจะยังคงส่งผลกระทบต่อเนื่องอย่างน้อยถึงปัจจุบัน ในช่วงที่เกิดการระบาดอย่างหนักและมีจำนวนผู้ติดเชื้อสูงขึ้นเรื่อย ๆ นั้น การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ รวดเร็ว จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพิ่มขีดความสามารถในตรวจคัดกรองเพื่อให้ทันต่อการรักษาผู้ป่วย ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว ลดอัตราการเกิดอาการรุนแรงและการเสียชีวิต รวมทั้งควบคุมการระบาดของโรคโควิด-19²⁻⁴

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการติดเชื้อที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ⁵⁻⁶ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจจับเชื้อในปริมาณน้อย ๆ ได้ และทราบผลภายในระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง ส่วนใหญ่ใช้หลักการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยเฉพาะเทคนิค real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ขั้นตอนเริ่มต้นที่สำคัญคือการสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสซึ่งเป็น RNA จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ก่อนเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในหลอดทดลองด้วย RT-qPCR ซึ่งมีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ บางชุดน้ำยาต้องมีขั้นตอนการเติมสารควบคุมคุณภาพภายใน (internal control; IC) ในกระบวนการสกัด ทำให้เพิ่มขั้นตอน ระยะเวลา และเพิ่มความเสี่ยงต่อความผิดพลาดในการเติม IC นอกจากนี้เมื่อมีตัวอย่างตรวจในปริมาณมาก การเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมมีความล่าช้า จะทำให้เกิดปัญหาคอขวด ไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ และรายงานผลตรวจได้ทันตามเวลาที่กำหนด

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยชุดน้ำยาทดสอบ AllplexTM 2019-nCoV assay ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด RNA ในกระบวนการทดสอบมาตรฐานที่ให้บริการในปัจจุบัน เพื่อให้ได้วิธีการที่สะดวก ประหยัด เวลา และความรวดเร็วในการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรค ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้ชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit ซึ่งเป็นชุดน้ำยาที่สามารถใส่ตัวอย่างตรวจลงในน้ำยาตรวจได้โดยตรง ไม่ต้องมีขั้นตอนการสกัด RNA และเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR กับชุดน้ำยาทดสอบ AllplexTM 2019-nCoV assay

วัตถุประสงค์ (Objectives)

1. เพื่อเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR ระหว่างชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit กับชุดน้ำยา AllplexTM 2019-nCoV assay
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพทางคลินิก ได้แก่ ค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value; NPV) ของชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit โดยเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาทดสอบ AllplexTM 2019-nCoV assay

วัสดุและวิธีการศึกษา (Materials and methods)

การวิจัยนี้ผ่านการรับรองตามมาตรฐานการปฏิบัติงานจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลสระบุรี เลขที่โครงการวิจัย SRBR64-046 รับรองเมื่อวันที่ 13 ธันวาคม 2564 ข้อมูลจากการวิจัยครั้งนี้ถือเป็นความลับและ



จะแสดงผลการวิจัยในภาพรวมเพื่อประโยชน์ในแง่ของประสิทธิภาพทางคลินิกของการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเท่านั้น

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

1 กรกฎาคม พ.ศ. 2564 – 31 มกราคม พ.ศ. 2565

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

ตัวอย่างที่เหลือจากการทดสอบในงานประจำวันได้แก่ nasopharyngeal swab และ throat swab (NPS+TS) ของผู้ป่วยจำนวน 73 ราย

น้ำยาและสารเคมี

1. ชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit ประกอบด้วย สารควบคุมคุณภาพผลบวก (positive control) สารควบคุมคุณภาพผลลบ (non-template control) น้ำยา CoviPrep และ PP mix
2. ชุดน้ำยา Allplex™ 2019-nCoV assay ประกอบด้วย สารควบคุมคุณภาพผลบวก (positive control) น้ำยา 2019-nCoV MOM, Real-time one step enzyme, 5X Real-time One-step buffer, RP-V IC และ RNase-free Water
3. น้ำยาสกัดสารพันธุกรรม Nucleic acid extraction kit T200-32

การเตรียมตัวอย่าง

1. สกัดสารพันธุกรรมในตัวอย่างที่จะทำการทดสอบของชุดน้ำยา Allplex™ 2019-nCoV assay ด้วยชุดน้ำยาสกัด Nucleic acid extraction kit T200-32 โดยเครื่องสกัดสารพันธุกรรม Zymo EXM6000
2. ตัวอย่างที่จะทำการทดสอบด้วยชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit ทำการเตรียมตัวอย่างโดยผสมตัวอย่างกับ น้ำยา CoviPrep ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (ตัวอย่าง nasopharyngeal swab 90 ไมโครลิตร + น้ำยา CoviPrep 10 ไมโครลิตร)

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2

ชุดน้ำยา Allplex™ 2019 nCoV assay CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit และ CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit ใช้หลักการทดสอบในรูปแบบ multiplex real-time RT-PCR assay เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 บริเวณยีนที่จำเพาะจำนวน 3 ยีน (*E* gene, *RdRp* gene, *N* gene) รวมทั้ง Internal Control (IC) พร้อม ๆ กัน ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น CFX96Touch Real-Time PCR Detection System

การอ่านผลและแปลผลตรวจ

ผลการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 จะถูกแปลผลและวิเคราะห์ผลอัตโนมัติโดยใช้โปรแกรม Seegene Viewer สำหรับชุดน้ำยา Allplex™ 2019-nCoV assay โดยใช้ค่า cut-off ของ Ct = 40.0 สำหรับยีน *E* ยีน *RdRp* และยีน *N* ชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RTqPCR Kit แปลผลโดยใช้ค่า cut-off ของ Ct = 38.0 สำหรับยีน *E* ยีน *RdRp* และยีน *N*

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างชุดน้ำยา Allplex™ 2019-nCoV assay และผลการทดสอบด้วยชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$

ผลการศึกษา (Result)

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ SARS-CoV-2 จากตัวอย่างจำนวน 73 ตัวอย่าง ระหว่างชุดน้ำยา Allplex™ 2019-nCoV assay และชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit โดยชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit ที่ให้ค่า Ct มากกว่า 38.0 ในยีน *RdRP* และ ยีน *N* หรือยีนใดยีนหนึ่ง รายงานผลเป็น N/A, ค่า Ct > 38.0 ในยีน *E* เพียงยีนเดียว รายงานผลเป็น Not detected พบผลที่ตรงกันจำนวน 66 ราย แบ่งเป็น 1) Detected ตรงกัน 21 ราย 2) Not detected ตรงกัน 45 ราย และพบผลที่ไม่สอดคล้องกันจำนวน 7 ราย (ตารางที่ 1) ผลการทดสอบความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit มีค่าเท่ากับร้อยละ 75.0, 100.0, 100.0 และ 86.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ผลการทดสอบความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) ของชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ค่า Ct < 15, 16-20, 21-25 และ > 25 มีค่าเท่ากับ 100%, 100%, 100% และ 68.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ผลการทดสอบความแตกต่างของค่า Ct ระหว่างชุดน้ำยาทดสอบ Allplex™ 2019-nCoV assay และชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit ทั้ง 3 ยีนเป้าหมาย พบว่า ค่า Ct ของยีน *E* และ *RdRp* ระหว่าง 2 ชุดน้ำยาแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.110$ และ $p = 0.169$ ตามลำดับ) ในขณะที่ ค่า Ct ของยีน *N* และ ด้วยชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit มีค่าสูงกว่าชุดน้ำยาทดสอบ Allplex™ 2019-nCoV assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.012$) (ตารางที่ 4)



ตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ SARS-CoV-2 ระหว่างชุดน้ำยา Allplex™ 2019-nCoV assay และ ชุดน้ำยา CoviQuick V2.0 RT-qPCR Kit

ตัวอย่าง หมายเลข	ชุดน้ำยา Allplex™ 2019-nCoV assay			การแปลผล	ชุดน้ำยา CoviQuick V2.0 RT-qPCR Kit			การแปลผล
	E (Ct)	RdRp (Ct)	N (Ct)		E (Ct)	RdRp (Ct)	N (Ct)	
1	18.55	19.44	20.92	Detected	24.76	21.30	26.22	Detected
2	18.28	19.44	20.92	Detected	24.78	22.06	26.42	Detected
3	17.59	18.55	19.60	Detected	32.68	29.53	32.22	Detected
4	28.53	33.01	30.29	Detected	N/A	35.19	31.67	Detected
5	16.32	17.66	18.65	Detected	23.57	20.32	28.55	Detected
6	17.61	21.73	20.12	Detected	25.18	21.42	26.54	Detected
7	14.11	21.73	20.12	Detected	23.74	20.44	28.33	Detected
8	17.99	18.90	20.41	Detected	25.78	22.24	26.54	Detected
9	14.83	16.31	17.71	Detected	26.48	23.37	29.65	Detected
10	18.62	19.86	21.24	Detected	30.94	27.67	30.55	Detected
11	29.59	34.12	31.61	Detected	37.95	35.62	37.16	Detected
12	38.08	N/A	37.13	Detected	N/A	N/A	N/A	Not detected
13	34.83	N/A	35.94	Detected	N/A	N/A	N/A	Not detected
14	32.76	36.99	34.61	Detected	N/A	N/A	N/A	Not detected
16	32.64	N/A	33.77	Detected	N/A	N/A	36.86	Detected
17	N/A	N/A	35.78	Detected	N/A	39.12	N/A	Not detected
18	31.62	N/A	33.17	Detected	N/A	35.36	N/A	Detected
19	36.83	N/A	36.95	Detected	N/A	N/A	N/A	Not detected
20	32.21	38.84	33.55	Detected	N/A	38.84	N/A	Not detected
21	29.78	35.86	31.27	Detected	N/A	38.18	30.34	Detected
22	32.47	35.10	32.67	Detected	35.33	33.77	32.64	Detected
23	31.01	32.53	31.89	Detected	32.92	30.81	30.18	Detected
24	28.61	34.88	30.65	Detected	36.88	37.30	31.45	Detected
25	26.31	31.24	28.68	Detected	34.01	30.92	36.55	Detected
28	N/A	N/A	36.31	Detected	N/A	N/A	N/A	Not detected
71	14.12	15.89	16.50	Detected	20.89	17.63	24.65	Detected
72	16.22	20.43	18.39	Detected	22.19	19.43	26.55	Detected
73	22.00	26.50	24.50	Detected	28.64	25.60	28.65	Detected
15, 26-27, 29-70	N/A	N/A	N/A	Not detected	N/A	N/A	N/A	Not detected

ตารางที่ 2 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit

		Allplex™ 2019-nCoV assay		
		ผลบวก	ผลลบ	รวม
CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit	ผลบวก	21	0	21
	ผลลบ	7	45	52
	รวม	28	45	73
ความไว		75.0% (21/28)		
ความจำเพาะ		100.0% (45/45)		
ค่าทำนายผลบวก		100.0% (22/22)		
ค่าทำนายผลลบ		86.5% (45/52)		

ตารางที่ 3 ค่าความไวทางคลินิก (Clinical sensitivity) ของชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกแบ่งตามช่วงค่า Ct

ค่า Ct	จำนวนตัวอย่าง	ความไว
< 15	2	100.0% (2/2)
16-20	4	100.0% (4/4)
21-25	3	100.0% (3/3)
> 25	19	68.4% (13/19)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแตกต่างของค่า Ct ระหว่างชุดน้ำยาทดสอบ Allplex™ 2019-nCoV assay และชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit

ยีนที่ทดสอบ	Allplex™ 2019-nCoV assay		CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit		p-value
	Mean	SD	Mean	SD	
E	24.9	7.4	26.6	6.4	0.110
RdRp	26.1	8.0	28.0	7.5	0.169
N	27.6	7.2	30.1	8.2	0.012



อภิปรายผลการศึกษา (Discussion)

ผลการทดสอบความไวทางคลินิกของชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit ให้ผลการทดสอบในระดับดีมาก โดยให้ค่าความไวร้อยละ 100.0 ในยืนยันเป้าหมายของตัวอย่างทดสอบที่มีค่า Ct < 25 แต่เมื่อค่า Ct > 25 ให้ค่าความไวลดลงอยู่ในระดับปานกลาง (ร้อยละ 68.4) โดยมีปัจจัยที่อาจส่งผลต่อค่าความไวของการทดสอบด้วยชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit ได้แก่ 1) ปริมาณของไวรัสหรือซากเชื้อที่มีปริมาณน้อย อาจทำให้ปริมาณ RNA ที่มาจากการเตรียมตัวอย่างโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ทำให้ความไวในการตรวจลดลง เนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในปฏิกิริยา PCR อาจเกิดขึ้นแบบสุ่ม (preferential amplification) ส่งผลให้ตรวจพบยีนที่ตำแหน่งต่างกันในแต่ละครั้งของปฏิกิริยา⁷ 2) สภาวะการติดเชื้อของแต่ละบุคคล ตัวแปร ส่วนบุคคล เช่น อายุ อาจส่งผลต่อความไวเช่นกัน⁸ นอกจากนี้ระยะเวลาการจัดเก็บตัวอย่าง และการ freeze-thaw ตัวอย่าง อาจมีผลต่อความไวในการทดสอบ การเปรียบเทียบค่า Ct ของทุกยืนยันเป้าหมายระหว่างน้ำยาทั้งสองชุดให้ค่าความแตกต่างอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้เฉพาะยีน E และ RdRp ส่วนยีน N เมื่อทดสอบด้วยชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit มีค่าสูงกว่าชุดน้ำยา AllplexTM 2019-nCoV assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.012$) โดยมีปัจจัยที่อาจส่งผลดังกล่าวได้แก่ ชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit มีค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 500 copies/ml ในขณะที่ชุดน้ำยาทดสอบ AllplexTM 2019-nCoV assay มีค่า LOD เท่ากับ 100 copies/ml

การศึกษานี้ พบความสอดคล้องของผลตรวจระหว่างน้ำยาทั้ง 2 ร้อยละ 90.4 ผลไม่สอดคล้องร้อยละ 9.6 โดยชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit เป็นความสอดคล้องผลบวกร้อยละ 75.0 และความสอดคล้องผลลบร้อยละ 100.0 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Merindol N และคณะ² ที่ทำการศึกษาคความไวของการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 จาก nasopharyngeal swab โดยตรง ไม่มีขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) เปรียบเทียบกับชุดน้ำยา AllplexTM 2019-nCoV rRT-qPCR พบค่าความสอดคล้องของผลบวกเท่ากับ 85.0% และความสอดคล้องของผลลบเท่ากับ 100.0% การนำชุดน้ำยาทดสอบ CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit มาใช้ในงานตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 จึงต้องพิจารณาปัจจัย เช่น กรณีที่ผู้ป่วยติดเชื้อมาระยะเวลาหนึ่ง โดยแต่ละบุคคลจะมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวรัสตลอดช่วงการติดเชื้อ⁹ ถึงแม้ว่าผลการทดสอบ RT-qPCR เป็นบวก แต่บุคคลนั้นอาจจะไม่ได้ติดเชื้อแล้ว เนื่องจากหลังการติดเชื้อมากกว่า 10-14 วัน ผลการทดสอบอาจให้ผลเป็นบวกได้เนื่องจากมี viable viral RNA หลงเหลืออยู่ในระยะเวลานี้¹⁰ และมีข้อมูลการศึกษาที่พบว่าความไวทางคลินิกของ RT-qPCR ในระบบทางเดินหายใจส่วนบนลดลงอย่างรวดเร็วในกรณีผู้ป่วยโควิด-19 ที่มีอาการไม่รุนแรง หรือมีการติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ ทำให้ผลการตรวจไม่พบเชื้อ หรืออาจพบผลกำกวม เมื่อเทียบกับการใช้ชุดน้ำยาทดสอบที่มีขั้นตอนการสกัด RNA¹¹

บทสรุป (Conclusion)

ในผู้ป่วยที่เพิ่งได้รับเชื้อทำให้มีปริมาณของไวรัสมากเพียงพอที่จะทำให้ความไวในการทดสอบของชุดน้ำยา CoviQuick v2.0 RT-qPCR Kit เป็นอีกทางเลือกในการตรวจเพื่อยืนยัน อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาในการทดสอบ เนื่องจากไม่ต้องมีขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง ทำให้การตรวจเพื่อยืนยันได้ผลการตรวจที่เร็วขึ้น รวมทั้งลดต้นทุนการตรวจทางห้องปฏิบัติการเนื่องจากไม่ต้องใช้น้ำยาสำหรับสกัดสารพันธุกรรม

ข้อเสนอแนะ (Recommendation)

1. หากพบผู้ป่วยที่มีอาการเข้าข่ายติดเชื้อ SARS-CoV-2 แต่มีผลการตรวจเบื้องต้นเป็นลบและมีปัจจัยเสี่ยง เช่น ใกล้ชิดผู้ติดเชื้อ อยู่ในแหล่งที่มีการระบาดของเชื้อสูง ควรแนะนำให้ทดสอบยืนยันเพิ่มเติมด้วยวิธี RT-qPCR เป็นต้น
2. หากมีการศึกษาเปรียบเทียบกลุ่มบุคคลที่ไม่มีอาการป่วยของระบบทางเดินหายใจ ไม่มีปัจจัยเสี่ยงในการสัมผัสใกล้ชิดผู้ติดเชื้อ แต่มีความเสี่ยงตามเกณฑ์สอบสวนโรค และหากผลการตรวจยืนยันด้วย RT-qPCR ให้ผลเป็นบวก อาจได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในทางระบาดวิทยาได้
3. เนื่องจากการกำหนดค่า cut off ในการแปลผลโดยใช้ค่า Ct ที่สูงมากเป็นปัญหาส่วนใหญ่ที่พบในการแปลผลตรวจในงานประจำวัน หากมีการกำหนดค่า cut off เดียวกันของห้องปฏิบัติการในการประเมิน เช่น ใช้ค่า Ct = 35 เพื่อลดอคติของทั้งสองชุดน้ำยา แล้วนำมาประเมินเปรียบเทียบกันจะทำให้ผลที่ได้มีความสอดคล้องมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ทนพ.เกรียงไกร กล้าประจันต์ หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสระบุรี และ ทนพ.พงษ์ชัย คำพรหม หัวหน้าห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสระบุรี ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ นายแพทย์อนันต์ กมลเนตร ผู้อำนวยการโรงพยาบาลสระบุรี ที่อนุญาตการเก็บข้อมูลการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณ อาสาสมัครในโครงการทุกท่านที่มีส่วนร่วมให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี



เอกสารอ้างอิง (References)

1. 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.
2. Merindol N, Pépin G, Marchand C, Rheault M, Peterson C, Poirier A, et al. SARS-CoV-2 detection by direct rRT-PCR without RNA extraction. *J Clin Virol*. 2020;128:1–4.
3. Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, et al. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clin Chem*. 2020;66(7):975–7.
4. Barza R, Patel P, Sabatini L, Singh K. Use of a simplified sample processing step without RNA extraction for direct SARS-CoV-2 RT-PCR detection. *J Clin Virol*. 2020;132:1–3.
5. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *J Clin Microbiol*. 2020;58(6):1–9.
6. Rabi FA, Al Zoubi MS, Al-Nasser AD, Kasasbeh GA, Salameh DM. Sars-cov-2 and coronavirus disease 2019: What we know so far. *Pathogens*. 2020;9(3):1–14.
7. Yang HC, Liang YJ, Huang MC, Li LH, Lin CH, Wu JY, et al. A genome-wide study of preferential amplification/hybridization in microarray-based pooled DNA experiments. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(15).
8. Binny RN, Priest P, French NP, Parry M, Lustig A, Hendy SC, et al. Sensitivity of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Tests for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 through Time. *J Infect Dis* [Internet]. 2023;227(1):9–17. Available from: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac317>
9. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(5):672–5.
10. Owusu D, Pomeroy MA, Lewis NM, Wadhwa A, Yousaf AR, Whitaker B, et al. Persistent SARS-CoV-2 RNA Shedding without Evidence of Infectiousness: A Cohort Study of Individuals with COVID-19. *J Infect Dis*. 2021;224(8):1362–71.
11. Bergmans BJM, Reusken CBEM, van Oudheusden AJG, Godeke GJ, Bonačić Marinović AA, de Vries E, et al. Test, trace, isolate: evidence for declining SARS-CoV-2 PCR sensitivity in a clinical cohort. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021;101(2).