

Evaluation of Specimen Pooling for SARS-CoV-2 Testing by Real Time RT-PCR in Khon Kaen Province

Nuttiya Srisurat, Sasiprapa Wattanavises and Pannicha Wongsachua

Department of Medical Technology, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand

Abstract

The objective of this study was to determine the optimal pool size and evaluate the SARS-CoV-2 (Corona virus 2019) testing by a real time RT-PCR with pooled samples compared to a single individual sample. The results showed that the pool of 5 samples could be used to detect the SARS-CoV-2 with real time RT-PCR. A total number of 310 nasopharyngeal swab and throat swab samples (17 positives and 293 negatives) were tested in 62 pooled samples compared to 310 single samples. The detection and non-detection rate of the pooled samples were 100% comparing to a single sample. With Cohen's Kappa analysis results indicated the perfect agreement of these two methods ($K = 1$). The cycle threshold (Ct) of pooled sample testing was greater than that of a single sample from 0.78 to 3.55 and 1.01 to 3.05 for ORF-1ab and N gene, respectively. The Bland-Altman plots showed that the Ct differences of 17 positive samples between the two methods were inside the limit of agreement, and their mean Ct differences were 2.06 and 2.28 for ORF-1ab and N genes, respectively. This study showed that a range of pool sizes from 2 to 5 samples per pool can be used to detect the presence of SARS-CoV-2 by a real time RT-PCR. As for the COVID-19 pandemic, the pooled sample testing can increase the test capacity of the laboratory, reducing the turnaround time of the result and save the reagent, which was limited and expensive. Lastly, it can relieve the workload of the laboratory. Nevertheless, the limitation of pooled sample testing is that samples with low viral load or the $Ct \geq 38$ could appear as a false-negative result.

Keywords: SARS-CoV-2, Pooled sample, Real time RT-PCR

*Corresponding author E-mail address: nsrisurat@gmail.com

Received: 17 April 2021

Revised: 2 June 2021

Accepted: 12 November 2021

ประเมินการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 จากตัวอย่างรวม ด้วยวิธี Real Time RT-PCR ในจังหวัดขอนแก่น

นัทธยา ศรีสุราช ศศิประภา วัฒนวิเศษ และ พรรณิชา วงศ์สายเชื้อ

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาขนาดของตัวอย่างรวมที่เหมาะสม (optimal pool size) และ ประเมินการตรวจการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (ไวรัสโคโรนา 2019) ด้วยวิธี real time RT-PCR แบบตัวอย่างรวม (pooled sample) เทียบกับการตรวจด้วยตัวอย่างเดี่ยว (single individual sample) ผลการศึกษา พบว่าการรวม 5 ตัวอย่างสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR ผลการทดสอบตัวอย่างจากผู้ป่วย 310 ตัวอย่าง (ผลบวก 17 ตัวอย่างและผลลบ 293 ตัวอย่าง) ด้วย 62 ตัวอย่างรวมเทียบกับ 310 ตัวอย่างเดี่ยว พบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อและตรวจไม่พบเชื้อของตัวอย่างรวมเทียบกับตัวอย่างเดี่ยวคิดเป็นร้อยละ 100 ผลการทดสอบของตัวอย่างทั้งสองแบบมีความสอดคล้องกันในระดับที่ดีมาก ค่า Cohen's Kappa (K) เท่ากับ 1 การตรวจแบบตัวอย่างรวมมีค่า cycle threshold (Ct) เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างเดี่ยว ระหว่าง 0.78-3.55 และ 1.01-3.05 สำหรับ ORF-1ab และ N gene ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า Ct ของ 17 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อด้วย Bland Altman Plot พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยมีค่า mean difference เท่ากับ 2.06 และ 2.28 สำหรับ ORF-1ab และ N gene ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้การรวมตั้งแต่ 2-5 ตัวอย่าง ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยวิธี real time RT-PCR ได้ กรณีที่มีการระบาดของโรคการใช้ตัวอย่างรวมจะช่วยรองรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีปริมาณมาก ลดระยะเวลารอดคอยผล ประหยัดค่าน้ำยาตรวจที่มีจำกัดและราคาแพง รวมถึงลดภาระงานของห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดที่ต้องระวังคือตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อน้อย หรือ Ct $\geq$ 38 อาจทำให้เกิดผลลบลงได้

คำสำคัญ: SARS-CoV-2 ตัวอย่างรวม Real time RT-PCR

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือ coronavirus disease 2019 (COVID-19) มีการรายงานครั้งแรกในประเทศจีนในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562^(1, 2) จากนั้นมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว และเป็นปัญหาสาธารณสุขทั่วโลก โดยเชื้อที่เป็นสาเหตุ ได้แก่ เชื้อไวรัสชนิด severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)⁽³⁾ อาการของโรคมีความแตกต่างกัน ผู้ป่วยบางรายติดเชื้อนี้โดยไม่แสดงอาการ^(4, 5) ส่วนใหญ่มีอาการไม่รุนแรง แต่บางรายอาจมีภาวะปอดอักเสบรุนแรงจนเกิดระบบการหายใจล้มเหลว หรือมีอวัยวะหลายระบบล้มเหลวนำไปสู่การเสียชีวิตได้ในที่สุด^(6, 7) ปัจจุบันการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เป็นที่ยอมรับในการค้นหาผู้ป่วยติดเชื้อ คือวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจและตรวจหาเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 วิธีนี้จึงจัดว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อมีความไว และความจำเพาะสูง⁽⁸⁾ สามารถรายงานผลการตรวจภายใน 3-4 ชั่วโมง แต่มีข้อจำกัดคือมีค่าใช้จ่ายสูง น้ำยาตรวจมีจำกัด ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง วิธีการตรวจมีความยุ่งยากต้องทดสอบ 2 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดสารพันธุกรรม (extraction) และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (amplification) รวมถึงการตรวจจับเชื้อ (detection)

จากสถานการณ์ทั่วโลก มีการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อ SARS-CoV-2 และมีรายงานผู้ป่วยยืนยันทั่วโลก สำหรับสถานการณ์ในประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขได้ประกาศให้เชื้อ SARS-CoV-2 ก่อโรค COVID-19 เป็นโรคติดต่ออันตราย ตาม

พระราชบัญญัติโรคติดต่อ พ.ศ. 2558 เมื่อวันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 โดยกำหนดเกณฑ์การค้นหาผู้ติดเชื้อ และมาตรการต่างๆ เพื่อควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังฯ สถานการณ์การระบาดภายในประเทศ การค้นหาผู้ติดเชื้อที่สำคัญคือการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR มีการกำหนดกลุ่มเป้าหมายในการตรวจเพื่อการวินิจฉัย การดูแลรักษา และการสอบสวนทางระบาดวิทยา ได้แก่ กลุ่มที่เข้าเกณฑ์ตามนิยามสอบสวนโรค (ปรับเปลี่ยนตามสถานการณ์การระบาด) ตามดุลยพินิจของแพทย์ และการตรวจก่อนการทำหัตถการ⁽⁹⁾ สำหรับโรงพยาบาลขอนแก่น ได้มีมาตรการต่างๆ เพื่อควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังฯ รวมถึงควบคุมการแพร่กระจายเชื้อในโรงพยาบาล ความปลอดภัยของผู้มารับบริการและบุคลากรทางการแพทย์ โดยหนึ่งในหลายมาตรการ คือการจัดทำแนวทางการค้นหาผู้ติดเชื้อ การดูแลผู้ป่วย COVID-19 ก่อนและหลังผ่าตัด การค้นหาผู้สัมผัสหรือผู้มีความเสี่ยงเมื่อตรวจพบผู้ติดเชื้อทั้งที่มีอาการและไม่มีอาการ ทำให้มีปริมาณการส่งตรวจเพิ่มขึ้นเป็น 150-200 ตัวอย่างต่อวัน หรือ 300-500 ตัวอย่างเมื่อตรวจพบผู้ติดเชื้อ ซึ่งส่งผลต่อการรายงานผลที่ล่าช้า จากสถานการณ์ดังกล่าวกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ทางห้องปฏิบัติการแบบตัวอย่างรวม (pooled sample testing) โดยกลุ่มตัวอย่างรวมที่ให้ผลการตรวจเป็นบวก (positive) จะถูกตรวจต่อในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธีเดิม เพื่อค้นหาตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่แท้จริง แนวคิดการตรวจแบบตัวอย่างรวมนี้ เคยมีการศึกษาในหลายประเทศ⁽¹⁰⁻¹⁶⁾ พบว่ามีประโยชน์มากในกลุ่มตัวอย่างที่มีความชุกของการติดเชื้อต่ำ การนำวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการแบบตัวอย่างรวมมาใช้ จะทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจ ลดภาระงานห้องปฏิบัติการ มีการรายงานผลที่

ทันเวลา เป็นผลให้การเฝ้าระวัง การป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ รวมถึงการควบคุมและป้องกันโรคมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาขนาดของตัวอย่างรวมที่เหมาะสม (optimal pool size) และประเมินวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR แบบตัวอย่างรวม เทียบกับการตรวจด้วยตัวอย่างเดี่ยว

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างตรวจ : ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจส่วนบน (nasopharyngeal swab และ throat swab) ที่ส่งตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยวิธี real time RT-PCR ซึ่งเก็บแช่แข็งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ณ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น ระหว่างเดือนมีนาคม - เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2563 ประกอบด้วย 1) ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 6 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของขนาดตัวอย่างรวม และ 2) ตัวอย่างจากผู้ป่วย 310 ตัวอย่าง (ผลบวก SARS-CoV-2 17 ตัวอย่าง และผลลบ 293 ตัวอย่าง) เพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้ตัวอย่างรวมที่ได้จากการศึกษา เทียบกับผลตรวจด้วยตัวอย่างเดี่ยวที่มีผลบวกชุดเดียวกัน การตรวจใช้ตัวอย่างควบคุม SARS-CoV-2 positive control จากชุดตรวจที่ใช้ เพื่อศึกษาปริมาณน้อยที่สุดที่ยังตรวจหาได้ (limit of detection, LOD) การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น รหัสโครงการวิจัย: KEXP63023

วิธีการทดสอบ

1. การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยวิธี real time RT-PCR⁽¹⁷⁾

ตัวอย่าง nasopharyngeal swab และ

throat swab ใน viral transport media (VTM) หรือ universal transport media (UTM) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุด TNA kit (The MagNA Pure LC total nucleic acid isolation kit, Roche Diagnostics) ซึ่งใช้ elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่องสกัดอัตโนมัติจาก The MagNA Pure LC instrument (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) นำตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาตรวจหา ORF-1ab gene และ N-gene ของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยชุดน้ำยา Novel Corona virus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic kit, Sansure Biotech Inc. ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้า real time PCR รุ่น MA6000 Real Time Quantitative Thermal Cycler แล้วแปลผลการทดสอบตามแนวทางของชุดน้ำยา ดังนี้ 1) ตรวจพบ 2 ยีนเป้าหมาย คือ ORF-1ab gene และ N-gene ของเชื้อ SARS-CoV-2 และมีค่า Ct ของทั้งสองยีน ไม่มากกว่า 40 รายงานผลเป็นบวก (positive) หรือพบเชื้อ (detectable) 2) ตรวจไม่พบทั้งสองยีน หรือมีค่า Ct มากกว่า 40 รายงานผลเป็นลบ (negative) หรือไม่พบเชื้อ (undetectable) 3) ตรวจพบเพียงยีนเดียว และมีค่า Ct ไม่มากกว่า 40 ถือว่าผลกำกวม รายงานผลเป็น inconclusive (Table 1) การทดสอบนี้มี RNaseP gene เป็นตัวควบคุมคุณภาพภายใน (internal control, IC) ในการควบคุมคุณภาพตัวอย่างตรวจ โดยชุดน้ำยามีขีดจำกัดของการตรวจพบเชื้อ (LOD) = 200 ก้อนปีต่อมิลลิลิตร

2. การหาขนาดของตัวอย่างรวมที่เหมาะสม (optimal pool size)

2.1 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบเชื้อ (LOD) ด้วยการเจือจางตัวควบคุมคุณภาพผลบวก

Table 1 Interpretation of the SAR-CoV2 testing by real time RT-PCR

Sample	Cycle threshold (Ct)			Interpretation
	ORF-1ab (FAM)	N gene (ROX)	Internal control (Cy5)	
Positive control	≤ 35	≤ 35	≤ 35	Pass
Negative control	No Ct or >40	No Ct or >40	No Ct or >40	Pass
Unknown 1	No Ct or >40	No Ct or >40	≤ 40	Undetectable
Unknown 2	≤ 40	≤ 40	≤ 40 or No Ct	Detectable
Unknown 3	Only one of two targets is positive		≤ 40 or No Ct	Inconclusive
Unknown 4	No Ct or >40	No Ct or >40	No Ct or >40	Indeterminate

(positive control) เพื่อหาปริมาณเชื้อที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจพบได้ โดยใช้ SARS-CoV-2 positive control (PC) จากชุดทดสอบ เจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold dilution) ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 5 ความเข้มข้น เป็น 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไปตรวจหา SARS-CoV-2 genome ความเข้มข้นสุดท้ายที่พบเชื้อ (final dilution PC) ถือว่าเป็นปริมาณเชื้อน้อยที่สุดที่ยังตรวจพบ

2.2 ศึกษาขนาดของตัวอย่างรวมที่เหมาะสม โดยนำความเข้มข้นสุดท้ายที่พบเชื้อของตัวควบคุมคุณภาพผลบวกไปศึกษาต่อแบบรวมตัวอย่าง โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นลดลงเป็น 1, 3, 5, 8, 10, 15 และ 20 เท่าเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 6 ราย ซึ่งนำมารวมกันเป็นหนึ่งตัวอย่างรวมแล้วเจือจางต่อด้วย UTM (สำหรับ pooled specimens) ให้ได้ความเข้มข้นลดลงเป็น 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 เท่า จากนั้นตรวจหาเชื้อในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี real time RT-PCR เพื่อหาขนาดที่เหมาะสมของตัวอย่างรวมต่อไป

3. การประเมินประสิทธิภาพการใช้ตัวอย่างรวมที่เหมาะสมเทียบกับการตรวจด้วยตัวอย่างเดียวในการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR^(10, 11)

ตัวอย่างจากผู้ป่วย 310 ตัวอย่าง (ผลบวก SARS-CoV-2 17 ตัวอย่างและผลลบ 293 ตัวอย่าง) นำมารวมเป็นตัวอย่างรวมกลุ่มละ 5 ตัวอย่างแบบสุ่มได้จำนวนทั้งหมด 62 กลุ่มตัวอย่าง กลุ่มตัวอย่างละ 250 ไมโครลิตร โดย 17 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ ได้ทดสอบแบบสุ่มให้อยู่ในกลุ่มตัวอย่างละ 1 ราย ได้เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีผลบวกรวมอยู่ด้วย 17 กลุ่มตัวอย่างที่ประกอบด้วยตัวอย่างผลบวก 1 รายกับตัวอย่างผลลบ 4 ราย นำแต่ละกลุ่มตัวอย่างไปตรวจหาเชื้อและเปรียบเทียบผลการทดสอบจากกลุ่มตัวอย่างบวกรวมในชุดเดียวกันกับตัวอย่างบวกเดียวเพื่อหาประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 โดยใช้สถิติร้อยละ Cohen's Kappa, Bland-Altman plot และค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่าง cycle threshold (Ct)

ผลการวิจัย

ผลการประเมินขีดจำกัดของชุดทดสอบที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเพื่อหาขนาดของตัวอย่างรวมที่เหมาะสม พบว่าตัวควบคุมคุณภาพผลบวกที่ระดับเจือจาง 1:1,000 ถือว่าเป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ตรวจพบเชื้อ มีค่า cycle threshold (Ct) เท่ากับ 37.14 และ 35.26 สำหรับ ORF-1ab gene และ N gene ตามลำดับ (Table 2) และเมื่อนำ final dilution PC มาตรวจต่อแบบรวมตัวอย่าง เปรียบเทียบกับการรวมของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ 6 ราย ในสัดส่วนที่เท่ากัน

พบว่าการรวมตัวอย่างด้วยสัดส่วน 1, 3 และ 5 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ โดย ORF-1ab gene มีค่า Ct เท่ากับ 28.92, 32.67 และ 37.14 ตามลำดับ และ N gene มีค่า Ct เท่ากับ 28.3, 31.97 และ 35.26 ตามลำดับ (Table 3) ส่วนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ 6 รายที่นำมา รวมกัน พบว่าทุกตัวอย่างรวมในสัดส่วนต่างๆ ตั้งแต่ 1-50 ตัวอย่าง ให้ผลการทดสอบเป็นตรวจพบเชื้อทั้งหมด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้การรวม 5 ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

Table 2 Limit of detection of SARS-CoV-2 virus genome results in 10-fold dilution of positive control

Positive control	Target gene (Ct)			Result
	ORF-1ab	N gene	IC	
1:10	28.92	28.3	31.37	Detectable
1:100	32.67	31.97	34.65	Detectable
1:1000	37.14	35.26	37.85	Detectable
1:10000	No Ct	38.71	No Ct	Undetectable
1:100000	No Ct	No Ct	No Ct	Undetectable
Positive control	25.17	25.01	28.15	PASS
Negative control	No Ct	No Ct	No Ct	PASS

Detectable: Ct of 2 target gene $\leq$ 40, Ct: Cycle threshold, IC: internal control

ผลการประเมินประสิทธิภาพของการทดสอบด้วยตัวอย่างรวมที่ได้จากการรวม 5 ตัวอย่าง ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ จากตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 310 ตัวอย่าง (ผลบวก 17 ตัวอย่าง และผลลบ 293 ตัวอย่าง) แบ่งเป็น 62 ตัวอย่างรวม เทียบกับ 310 ตัวอย่างเดี่ยว พบว่ามีความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 และมีค่าทำนายความแม่นยำผลบวก (positive predictive value; PPV) และ

ค่าทำนายความแม่นยำผลลบ (negative predictive value; NPV) ร้อยละ 100 (Table 4) โดยสามารถตรวจพบเชื้อทั้งหมด 17 กลุ่มตัวอย่างรวม อีก 45 กลุ่มตัวอย่างรวมตรวจไม่พบเชื้อ อัตราการตรวจพบเชื้อและตรวจไม่พบเชื้อจากตัวอย่างรวมเทียบกับตัวอย่างเดี่ยวเป็นร้อยละ 100 ผลการทดสอบด้วยตัวอย่างทั้งสองแบบมีความสอดคล้องกันในระดับที่ดีมาก มีค่า Cohen's Kappa (K) เท่ากับ 1 (Table 4) โดย 17

Table 3 Comparison of the SARS-CoV-2 genome detection in pool between final positive control (1:1000) and pool of 6 positive samples

No. of sample in pool	Final positive control (Ct)				Pool of 6 positive samples (Ct)			
	ORF-1ab	N gene	IC	Result	ORF-1ab	N gene	IC	Result
1	37.14	35.26	37.85	Detectable	31.53	30.30	29.59	Detectable
3	39.01	38.94	No Ct	Detectable	33.59	31.90	25.82	Detectable
5	38.85	39.91	No Ct	Detectable	34.50	33.13	26.23	Detectable
8	40.69	43.29	No Ct	Undetectable	35.16	33.40	25.7	Detectable
10	37.59	No Ct	No Ct	Inconclusive	35.17	33.58	25.85	Detectable
15	38.69	No Ct	No Ct	Inconclusive	35.15	33.72	25.55	Detectable
20	No Ct	No Ct	No Ct	Undetectable	35.50	33.47	25	Detectable
25	ND	ND	ND	ND	35.52	35.34	25.48	Detectable
40	ND	ND	ND	ND	38.15	36.35	25.75	Detectable
50	ND	ND	ND	ND	38.01	36.77	25.39	Detectable
PC	25.1	24.5	28.07	PASS	24.82	23.96	26.29	PASS
NC	No Ct	No Ct	No Ct	PASS	No Ct	No Ct	No Ct	PASS

Ct: Cycle threshold, Detectable: Ct of 2 target gene $\leq$ 40, PC: Positive control, NC: Negative control, ND: Not done

Table 4 Performance of pooled test (5 samples per pool) compared with individual sample

	Individual test		Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Kappa (K)
	Detectable	Undetectable					
Pool test							
Detectable	17	0	100%	100%	100%	100%	1
Undetectable	0	293					

PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value

ตัวอย่างรวมที่ตรวจพบเชื้อ มีค่า Ct ของ ORF-1ab gene และ N gene อยู่ระหว่าง 18.62-39.21 และ 18.31-37.27 ตามลำดับ การตรวจแบบตัวอย่างรวม มีค่า Ct เพิ่มขึ้นจากการตรวจด้วยตัวอย่างเดี่ยวระหว่าง 0.78-3.55 และ 1.01-3.05 สำหรับ ORF-1ab gene และ N gene ตามลำดับ (Table 5 และ

Table 5 Comparison the SARS-CoV-2 genome results between 17 individual positive samples and pools of 5 samples in the same positive set.

Sample	Cycles threshold of target gene (Ct)								
	ORF-1ab			N gene			RNase P gene (IC)		
	Individual	Pool of 5	Ct Diff	Individual	Pool of 5	Ct Diff	Individual	Pool of 5	Ct Diff
COV1	28.57	31.61	3.04	27.71	30.74	3.03	26.48	26.54	0.06
COV2	30.11	32.34	2.23	28.84	30.79	1.95	25.94	25.48	-0.46
COV3	31.06	32.87	1.81	29.49	31.78	2.29	27.34	24.98	-2.36
COV4	32.90	33.68	0.78	30.43	32.12	1.69	27.83	24.82	-3.01
COV14	33.33	35.62	2.29	32.44	34.48	2.04	26.67	25.09	-1.58
COV24	31.53	34.50	2.97	30.30	33.13	2.83	29.59	26.23	-3.36
COV25	17.68	18.62	0.94	17.3	18.31	1.01	26.26	22.88	-3.38
COV28	21.18	24.73	3.55	21.00	23.64	2.64	26.4	23.07	-3.33
COV30	37.34	39.21	1.87	34.76	37.27	2.51	27.14	23.30	-3.84
COV35	33.06	34.50	1.44	31.48	33.01	1.53	26.65	22.88	-3.77
COV42	21.21	23.19	1.98	19.33	22.86	3.53	23.53	23.01	-0.52
COV45	25.6	28.03	2.43	25.02	27.57	2.55	23.62	23.62	0
COV48	21.05	24.03	2.98	20.32	23.36	3.04	24.02	23.43	-0.59
COV50	35.69	36.63	0.94	34.77	36.32	1.55	24.78	23.17	-1.61
COV54	33.84	34.4	0.56	31.74	33.12	1.38	26.17	22.86	-3.31
COV59	25.88	28.37	2.49	25.42	27.92	2.5	25.06	23.07	-1.99
COV60	22.04	24.69	2.65	21.04	23.75	2.71	25.8	23.97	-1.83
Mean	28.36	30.41	2.06	27.14	29.42	2.28	26.08	24.02	-2.05
SD	1.46	1.38	0.21	1.36	1.31	0.17	0.38	0.30	1.37

RNase P gene as the internal control, Detectable: Ct of 2 target gene $\leq$ 40, Ct: cycle threshold, IC: internal control, SD: standard deviation

Fig. 1) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า Ct ของ 17 ตัวอย่างรวมที่ตรวจพบเชื้อเทียบกับตัวอย่างเดี่ยวด้วย Bland Altman plot พบว่าความแตกต่างของ Ct อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ณ ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีค่า mean difference เท่ากับ 2.06 และมี limit of agreement (LoA) เท่ากับ 0.32-3.79 สำหรับ ORF-1ab ส่วน N gene มีค่า mean

difference เท่ากับ 2.28 และ LoA เท่ากับ 0.94-3.63 (Fig. 2) ค่า Ct ของตัวอย่างรวมและตัวอย่างเดี่ยวมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันในระดับสูง ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9898 และ 0.9928 สำหรับ ORF-1ab gene และ N gene ตามลำดับ (Fig. 3)

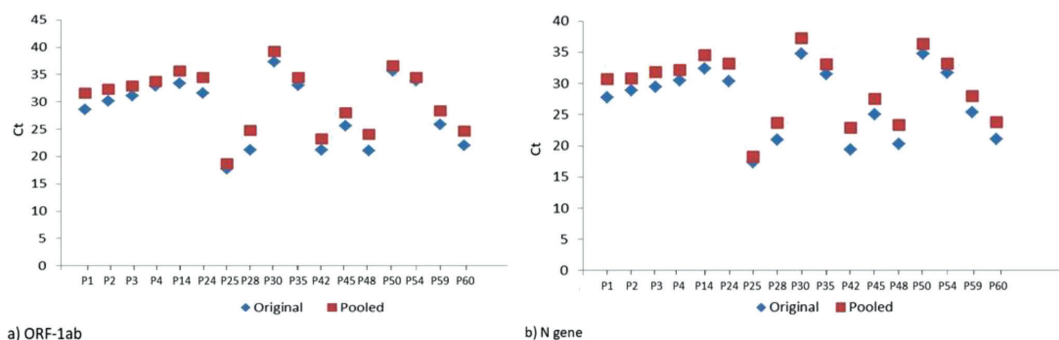
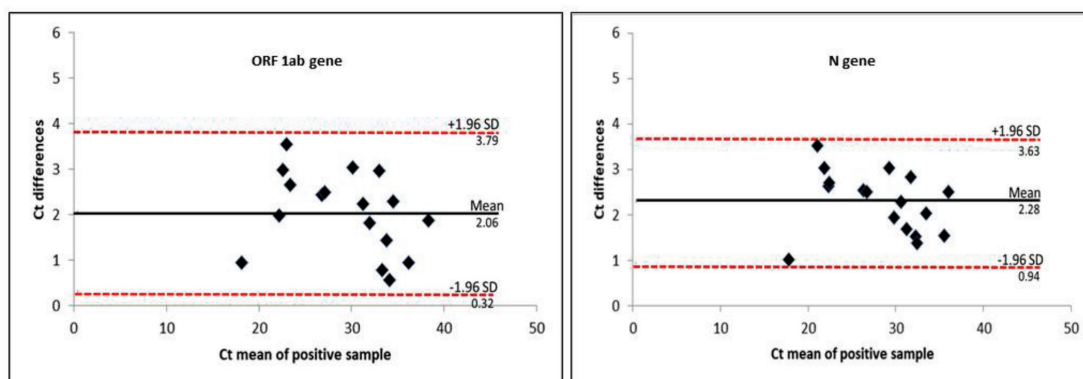


Fig. 1 Ct values of original (single) versus pooled samples. a) ORF-1ab gene, b) N gene



The ORF-1ab and N gene were used to detect SARS-CoV-2 by real time RT-PCR testing, Ct: cycle threshold

Fig. 2 The Bland-Altman plot demonstrate the Ct difference of ORF-1ab and N gene compared between positive original and pooled samples by real time RT-PCR

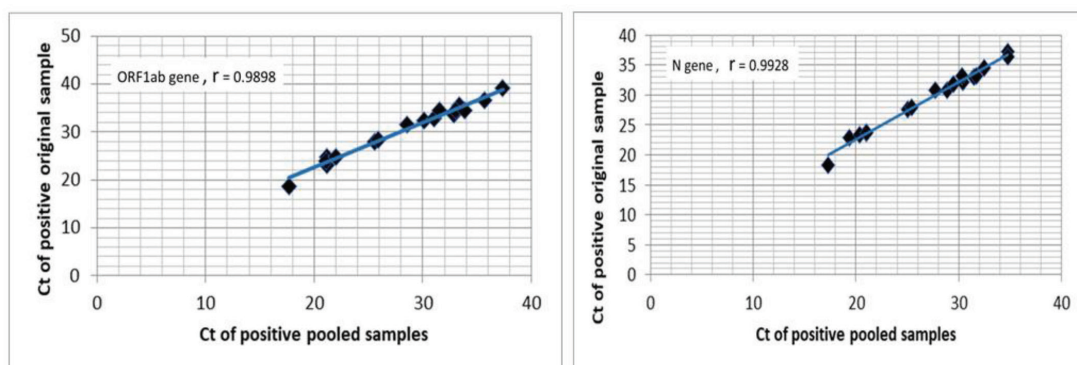


Fig. 3 Scatter plot and Spearman correlation coefficient (r) of ORF-1ab and N gene cycle threshold between positive original and positive pool samples

วิจารณ์

การตรวจยืนยันการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR ของตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจแบบตัวอย่างเดี่ยว ถือเป็นวิธีมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ⁽¹⁸⁾ แต่ในสถานการณ์ที่มีการระบาดของโรค และจำนวนการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการมีปริมาณมาก มีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ต้องสามารถดำเนินการควบคุมการระบาดของโรคให้เร็วที่สุด ซึ่งต้องอาศัยผลตรวจทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็ว เพื่อให้ทันเวลากับสถานการณ์ที่มีการระบาด และสามารถดำเนินการควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ห้องปฏิบัติการในหลายพื้นที่ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธี real-time RT-PCR ด้วยการรวมตัวอย่าง (sample pooling)^(10-16, 19) โดยมีการศึกษาการใช้ตัวอย่างรวมในรูปแบบต่าง ๆ ตั้งแต่การรวม RNA หลังการสกัด⁽¹⁶⁾ การรวม swab ในหลอดเดียว⁽¹⁹⁾ และการรวมตัวอย่างตรวจก่อนการสกัด⁽¹⁰⁻¹⁵⁾ การศึกษานี้ได้ตั้งต้นจากการประเมินขนาดของตัวอย่างรวมที่เหมาะสมด้วยการเจือจางตัวอย่างควบคุมคุณภาพผลบวกเพื่อหาปริมาณเชื้อที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจพบเชื้อได้ จากนั้นนำตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อน้อยที่สุดมาตรวจต่อด้วยการรวมตัวอย่าง ตั้งแต่ขนาดตัวอย่างรวมจาก 1-20 ตัวอย่าง พบว่าขนาดตัวอย่างรวมมากที่สุด 5 ตัวอย่าง ยังคงสามารถใช้ตรวจหาการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR ได้

ชุดน้ำยาที่ใช้ในการศึกษานี้มียื่นเป้าหมาย 2 ยีน คือ ORF-1ab gene กับ N gene โดยมี RNase P เป็นตัวควบคุมคุณภาพภายใน ในการควบคุมคุณภาพตัวอย่างตรวจ การแปลผลว่าพบเชื้อ หรือไม่พบเชื้อ ขึ้นกับค่า cycle threshold (Ct) ซึ่งเป็นจำนวนรอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ real-time PCR (กำหนดไว้ที่ 45 รอบ) โดยการแปลผลว่าพบเชื้อต้องสามารถตรวจพบยื่นเป้าหมายทั้งสอง

ยีน และมีค่า $Ct \leq 40$ cycle เพื่อให้มั่นใจว่าการใช้ตัวอย่างรวม 5 ตัวอย่างในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี real time RT-PCR ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง ลดโอกาสการเกิดผลลบลงมากที่สุดเมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างผู้ป่วย ผู้วิจัยได้ประเมินปริมาณเชื้อในตัวอย่างผู้ป่วย โดยนำตัวอย่างผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ 6 ราย มารวมกันในสัดส่วนเท่ากัน จากนั้นนำไปทดสอบแบบตัวอย่างรวม ตั้งแต่ 1 ถึง 50 ตัวอย่าง พบว่าทุกกลุ่มตัวอย่างรวม สามารถตรวจพบยื่นเป้าหมายทั้ง 2 ยีน ตามแนวทางการแปลผลตรวจของชุดน้ำยา

ผู้วิจัยได้ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ตัวอย่างรวมในการตรวจยืนยันเชื้อก่อโรคโควิด-19 โดยการทดสอบกับตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอาการเข้าได้ตามนิยามการสอบสวนโรค (Patient Under Investigation; PUI) และผู้ป่วยก่อนผ่าตัดที่ต้องตรวจคัดกรองก่อนการทำหัตถการ (pre-operation) ตามที่กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขกำหนด จำนวน 310 ตัวอย่าง (ผลบวก 17 ตัวอย่าง และผลลบ 293 ตัวอย่าง) แบ่งเป็น 62 ตัวอย่างรวม โดยเลือกใช้ตัวอย่างรวมที่ประกอบด้วยตัวอย่างผลบวก 1 ราย และผลลบ 4 ราย ซึ่งปริมาณของไวรัสในตัวอย่างรวมถูกเจือจางมากที่สุด ดังนั้นจึงมีโอกาสเกิดผลลบลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ประกอบด้วยตัวอย่างผลบวก 2-5 รายต่อกลุ่มตัวอย่างรวม ที่ถูกเจือจางน้อยกว่า และมีโอกาสตรวจพบเชื้อได้มากกว่าตามสัดส่วนของตัวอย่างผลบวกในตัวอย่างรวม ผลการศึกษานี้พบว่าการรวม 5 ตัวอย่างไม่แตกต่างจากการทดสอบด้วยตัวอย่างเดี่ยว หลายการศึกษาพบว่าการใช้ตัวอย่างรวมซึ่งประกอบด้วยตั้งแต่ 1-10 ตัวอย่าง ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง สอดคล้องกับการใช้ตัวอย่างเดี่ยว⁽¹⁰⁻¹⁴⁾ การใช้ตัวอย่างรวมสามารถลดค่าใช้จ่ายของน้ำยาตรวจ ลดระยะเวลาในการรายงานผล รวมถึงภาระงานของห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่มี

ปริมาณการส่งตรวจมาก^(11, 13, 20) แต่ข้อจำกัดคือกรณี
ที่ผลตรวจพบเชื้อในกลุ่มตัวอย่างรวม จะใช้เวลาใน
การรายงานผลในกลุ่มตัวอย่างนั้นเพิ่มขึ้น 2-3 ชั่วโมง
เนื่องจากการต้องมีการตรวจซ้ำด้วยตัวอย่างเดี่ยว เพื่อหา
ตัวอย่างบวกที่แท้จริง การตรวจด้วยตัวอย่างรวมจึงมี
ประโยชน์มากในพื้นที่ที่มีอัตราการตรวจพบเชื้อต่ำ^(11, 20)
สำหรับประเทศไทย จากรายงานขององค์การอนามัย
โลกประจำประเทศไทย รายงานผู้ป่วยยืนยันสะสม
จำนวน 187,538 ราย คิดเป็นอัตราการตรวจพบ
ผู้ติดเชื้อเพียงร้อยละ 0.28⁽²¹⁾ อย่างไรก็ตาม
อีกข้อจำกัดที่ต้องระวังจากการใช้ตัวอย่างรวมคือ
ผลกระทบของการเจือจางตัวอย่างก่อนการทดสอบ
(dilution effect) อาจทำให้เกิดผลลบปลอมได้ โดยเฉพาะ
ในตัวอย่างตรวจที่มีปริมาณเชื้อไวรัส (viral
load) ต่ำ หรือ cycle threshold สูง⁽¹⁶⁾ การศึกษานี้
ทดสอบใน 17 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อซึ่งมีปริมาณของ
เชื้อไวรัส หรือมี cycle threshold ที่แตกต่างกัน
สำหรับ ORF-1ab และ N gene ตั้งแต่ 17.68-37.34
และ 17.30-34.77 ตามลำดับ การทดสอบด้วย
ตัวอย่างรวมในตัวอย่างชุดเดียวกัน แม้ให้ผลการ
ทดสอบที่ไม่แตกต่างจากการใช้ตัวอย่างเดี่ยว แต่ผล
จากการเจือจางตัวอย่างทำให้ค่า Ct ของยีนเป้าหมาย
เพิ่มขึ้น 2.06 และ 2.28 cycle สำหรับ ORF-1ab
และ N gene ตามลำดับ ดังนั้นตัวอย่างตรวจที่มีค่า
cycle threshold ≥ 38 cycle อาจทำให้ผลการ
ทดสอบออกมาเป็นตรวจไม่พบเชื้อได้ ดังนั้นเมื่อใช้
การทดสอบแบบรวมตัวอย่าง จึงควรระมัดระวังกรณี
ที่ทดสอบด้วยตัวอย่างรวมแล้วพบค่า Ct สูงๆ หรือ
มากกว่า 40 รอบ (จำนวนรอบการเพิ่มจำนวนสาร
พันธุกรรม ของ real-time PCR กำหนดไว้ที่ 45
รอบ) ควรนำมาตรวจซ้ำด้วยตัวอย่างเดี่ยว

สรุป

การศึกษานี้ได้ทดสอบหาขนาดของตัวอย่าง
รวมที่เหมาะสมสำหรับการตรวจยืนยันการติดเชื้อ
SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time RT-PCR จาก
ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจส่วนบน พบว่า
ตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจพบเชื้อด้วยตัวอย่างเดี่ยว
สามารถตรวจพบเชื้อได้จากการรวมตัวอย่างตั้งแต่ 1-5
ตัวอย่าง ดังนั้นการใช้ตัวอย่างรวมจึงเป็นอีกทางเลือก
ของห้องปฏิบัติการ กรณีที่มีการส่งตรวจในปริมาณมาก
เช่น การตรวจคัดกรองเพื่อเฝ้าระวังฯ และสอบสวน
โรค การตรวจคัดกรองก่อนผ่าตัด การใช้ตัวอย่างรวม
จะช่วยประหยัดค่าน้ำยาตรวจที่มีจำกัดและราคาแพง
ลดภาระงานของบุคลากรห้องปฏิบัติการ รวมถึงลด
ระยะเวลาการรายงานผล ทั้งนี้ต้องมีการจัดทำระบบ
คุณภาพให้ได้เกณฑ์กำหนดที่ถูกต้องด้วย เพื่อให้
บุคลากรทางการแพทย์สามารถดำเนินการควบคุม
ป้องกัน และเฝ้าระวังโรคติดเชื้อโคโรนา 2019 ได้อย่าง
มีประสิทธิภาพมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาล
ขอนแก่น หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์
โรงพยาบาลขอนแก่น ที่อนุญาตให้สามารถทำการ
ศึกษาวิจัยได้ ขอขอบคุณคณะกรรมการจริยธรรมการ
วิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น ที่ได้ช่วยทบทวน
โครงร่างงานวิจัยให้ออกมาอย่างสมบูรณ์ และ
ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาล
ขอนแก่นทุกท่าน ที่รวบรวมและเก็บตัวอย่าง รวมทั้ง
ผู้ป่วยทุกรายที่ได้ให้ตัวอย่างทดสอบเพื่อศึกษาวิจัยใน
ครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Zhou P, Yang XL, Wang XG, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579: 270-3.
2. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* 2020; 26: 450-2.
3. Lu R, Zhao X, Li J, *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395: 565-74.
4. Bai Y, Yao L, Wei T, *et al.* Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA* 2020; 323: 1406-7.
5. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill* 2020; 25: 1-5.
6. Murthy S, Gomersall CD, Fowler RA. Care for Critically Ill Patients With COVID-19. *JAMA* 2020; 323: 1499-1500.
7. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, *et al.* COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up. *JACC* 2020; 75: 2950-73.
8. Corman VM, Landt O, Kaiser M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25: 1-8.
9. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. [home page on the Internet]. Thailand: "Laboratory Targeted Group for Coronavirus Disease 2019 infection. Testing for diagnosis, care, investigation and surveillance among risk populations".; Updated May 2, 2020 [cited 2021 April 6]. Available from: https://ddc.moph.go.th/viralpneumonia/file/g_srvt/g_srvt_target_group.pdf. (in Thai)
10. Lohset S, Pfuhr T, Berko-Gottel B, *et al.* Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people. *Lancet Infect Dis* 2020; 20: 1231-2.
11. Abdalhamid B, Bilder CR, McCutchen EL, Hinrichs SH, Koepsell SA, Iwen PC. Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS-CoV-2 Testing Resources. *Am J Clin Pathol* 2020; 153: 715-8.
12. Lim KL, Johari NA, Wong ST, *et al.* A novel strategy for community screening of SARS-CoV-2 (COVID-19): Sample pooling method. *PloS One* 2020; 15: 1-10.
13. Li H, Sun K, Persing DH, Tang YW, Shen D. Real-time Screening of Specimen Pools for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection at Sanya Airport, Hainan Island, China. *Clin Infect Dis*. [serial on the Internet]. 2020 [cited 2020 September 30]. Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1074;1-3.pdf>

14. Sahajpal NS, Mondal AK, Njau A, *et al.* Proposal of RT-PCR-Based Mass Population Screening for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Coronavirus Disease 2019). *J Mol Diagn.* 2020; 22: 1294-9.
15. Praharaj I, Jain A, Singh M, *et al.* Pooled testing for COVID-19 diagnosis by real-time RT-PCR: A multi-site comparative evaluation of 5- & 10-sample pooling. *Indian J Med Res* 2020; 152: 88-94.
16. Khodare A, Padhi A, Gupta E, Agarwal R, Dubey S, Sarin SK. Optimal size of sample pooling for RNA pool testing: An avant-garde for scaling up severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 testing. *Indian J Med Microbiol* 2020; 38: 18-23.
17. Department of Medical Sciences Ministry of Public Health. Manual of Laboratory Diagnostic of Coronavirus 2019 infection (COVID-19). Thailand: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health: 2020 [cited 2021 June 14]. Available from: <https://www3.dmsc.moph.go.th/post-view/700> (in Thai)
18. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance, 17 January 2020. 2020; [cited 2020 Jul 14]. Available from: URL: [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-(2019-ncov)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020).
19. Schmidt M, Hoehl S, Berger A, *et al.* Novel multiple swab method enables high efficiency in SARS-CoV-2 screenings without loss of sensitivity for screening of a complete population. *Transfusion* 2020; 60: 2441-7.
20. Aragón CD, Fernández SJ, Laroze D. Optimization of group size in pool testing strategy for SARS-CoV-2: A simple mathematical model. *J Med Virol* 2020; 92: 1988-94.
21. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): WHO Thailand Situation Report. Thailand situation update No. 187; [cited 2021 June 14]. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/searo/thailand/2021_06_03_eng-sitrep-187-covid19.pdf?sfvrsn=e2720674_8