

Development and Evaluation of ELISA Method for the Detection of SARS-CoV-2 RBD Protein Antibody

Nadthanan Pinyosukhee^{1*}, Panadda Dhepakson¹, Apichai Prachasuphap¹,
Rattanawadee Wichajarn¹, Nuchanat Chatchawankanpanich¹,
Trairong Chokwassanasakulkit¹, Lapasrada Pattarapreeyakul¹,
Kodcharad Jongpitisub¹, Kritsamon Sophondilok¹, Sakulrat Soonthorncharttrawat¹,
Parnuphan Panyajai¹, Wiroj Puangtubtim¹, Warangluk Pimpapai¹,
Supaporn Phumiamorn² and Surakameth Mahasirimongkol¹

¹Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi Province, Thailand

²Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi Province, Thailand

Abstract

COVID-19 is caused by SARS-CoV-2 virus, an emerging virus classified as a highly pathogenic virus that has spread worldwide. The antibody against SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) can be stimulated via natural infection or vaccination. In this study, the anti SARS-CoV-2 RBD IgG ELISA for the qualitative, semi-quantitative, and quantitative determination of infected and vaccinated human serum or plasma samples was developed. Analysis results of the qualitative detection revealed the cut-off values of the 1:200 dilution of negative sera, which were set up as mean values with two and three standard deviations, were 1.4447 and 1.8223 ELISA units and the specificity of negative sera were 93.94% and 98.27%, respectively. Furthermore, the sensitivity of positive sera at both cut-off values were 100%. The cross-reactivity were 6% and 0% at 1.4447 and 1.8232 cut-off values, respectively. There was no significant correlation between interferences and the sample sera ($p > 0.05$). For semi-quantitative determination, antibody concentration of 1:200 diluted samples could be determined via the standard curve ranging between 13.48-62.50 BAU/mL. However, higher antibody concentration sera had to be more diluted than 1:200 to be quantified by using the same standard curve. Additionally, when the antibody quantitative ELISA results were compared to the quantitative analysis results using chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) the correlation of 0.93 ($p < 0.001$) was obtained. Consequently, the newly developed ELISA method can be further used to determine the antibody against SARS-CoV-2 RBD.

Keywords: Covid-19, SARS-CoV-2, RBD, ELISA, Antibody

*Corresponding author E-mail address: nadthanan.p@dmsc.mail.go.th

Received: 8 October 2022

Revised: 28 February 2023

Accepted: 12 April 2023

การพัฒนาและการประเมินวิธีอิมูโนอัสซายสำหรับตรวจแอนติบอดี ต่อโปรตีน RBD ของเชื้อ SARS-CoV-2

ณัฐนันท์ ภิญญิตส์^{1*} ปณิตดา เทพอักษร¹ อภิชัย ประชาสุภาพ¹ รัตนาวดี วิชาจารย์¹
นุชนาถ ชัชวาลการพาณิชย์¹ ไตรรงค์ โชควาสนาสกุลกิจ¹ ถภัสสรดา ภักธรปรียากุล¹
กชรัตน์ จงปิติทรัพย์¹ กฤษมน โสภณดิลก¹ สกฤตรัตน์ สุนทรฉัตรวิวัฒน์¹ ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ¹
วิโรจน์ พวงทับทิม¹ วรางค์กษณ์ พิมพาภัย¹ สุภาพร ภูมิอมร² และ สุรัคเมธ มหาศิริมงคล¹

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี

²สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี

บทคัดย่อ

โรคโควิด-19 เกิดจากไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นเชื้ออุบัติใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่มอันตรายร้ายแรง โดยมีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก การติดเชื้อตามธรรมชาติหรือการได้รับวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน receptor binding domain (RBD) ของเชื้อ SARS-CoV-2 การศึกษานี้จึงพัฒนาวิธีอิมูโนอัสซายสำหรับตรวจแอนติบอดีชนิด IgG ต่อโปรตีน RBD ของเชื้อ SARS-CoV-2 เพื่อใช้ในการตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative) เชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) และเชิงปริมาณ (quantitative) ในตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาของผู้ติดเชื้อหรือผู้รับวัคซีน จากการวิเคราะห์ผลพบว่าการตรวจเชิงคุณภาพของตัวอย่างที่เจือจาง 1:200 หากค่าจุดตัด (cut-off) จากตัวอย่างผลลบ โดยใช้ค่าเฉลี่ยบวกค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสองเท่าและสามเท่าได้ค่า 1.4447 และ 1.8232 หน่วยอิมูโนอัสซายตามลำดับ โดยมีค่าความจำเพาะร้อยละ 93.94 และ 98.27 ตามลำดับ ส่วนการตรวจผลบวกมีค่าความไวที่ร้อยละ 100 ที่ค่า cut-off 1.4447 และ 1.8232 และพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามร้อยละ 6 และ 0 ที่ค่า cut-off 1.4447 และ 1.8232 ตามลำดับ ส่วนการรบกวนปฏิกิริยาไม่มีผลกระทบต่อผลการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในการตรวจเชิงกึ่งปริมาณสามารถอ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 13.48-62.50 BAU ต่อมิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างที่เจือจาง 1:200 และสามารถหาปริมาณแอนติบอดีของตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงที่ต้องเจือจางมากกว่า 1:200 โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน วิธีอิมูโนอัสซายสามารถตรวจหาปริมาณแอนติบอดีโดยมีค่าความสัมพันธ์กับการตรวจด้วยวิธี chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) เท่ากับ 0.93 ($p < 0.001$) แสดงให้เห็นว่าวิธีตรวจที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน RBD ของเชื้อ SARS-CoV-2 ได้ต่อไป

คำสำคัญ: โควิด-19, SARS-CoV-2, RBD, อิมูโนอัสซาย, แอนติบอดี

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: nadthanan.p@dmsc.mail.go.th

รับบทความ: 8 ตุลาคม 2565

แก้ไขบทความ: 28 กุมภาพันธ์ 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 12 เมษายน 2566

บทนำ

โรคโควิด-19 (coronavirus disease 2019; COVID-19) เกิดจากไวรัส severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2 (SARS-CoV-2) ซึ่งเป็นเชื้ออุบัติใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีอันตรายร้ายแรงและมีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก⁽¹⁾ กรมควบคุมโรครายงานข้อมูล ณ วันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2565 ว่าทั่วโลกมีจำนวนผู้ติดเชื้อสะสม 599,071,265 ราย และเสียชีวิต 6,467,021 ราย ส่วนประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อสะสม 4,633,468 ราย และเสียชีวิต 32,400 ราย⁽²⁾ ไวรัส SARS-CoV-2 เป็นไวรัสชนิดที่มีเยื่อหุ้มไขมันล้อมรอบ (enveloped RNA virus) จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Coronaviridae* สกุล (genus) *Betacoronavirus* มีสารพันธุกรรมเป็น positive sense single stranded RNA ความยาวประมาณ 30 กิโลเบส จากรายงานผลลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 พบว่ามีรหัสพันธุกรรมใกล้เคียงกับ SARS-CoV ร้อยละ 79 และ Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) ร้อยละ 50 ซึ่งเป็นไวรัสในสกุล *Betacoronavirus* เช่นเดียวกันและเคยมีการระบาดก่อนหน้านี้ในปี พ.ศ. 2545 และ พ.ศ. 2555 ตามลำดับ⁽³⁾

ไวรัส SARS-CoV-2 ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ได้แก่ nucleocapsid (N), envelope (E), membrane (M) และ spike (S)⁽⁴⁾ โดย N เป็นโปรตีนที่จับบนสายอาร์เอ็นเอของไวรัสและยึดเกาะกับเยื่อหุ้มของไวรัส ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการถอดรหัสพันธุกรรม ME และ S เป็นโปรตีนโครงสร้างที่อยู่บนผิวของอนุภาคไวรัส โดย S ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ ประกอบด้วยส่วน S1 ทำหน้าที่จับกับเซลล์มนุษย์โดยใช้บริเวณ receptor binding domain (RBD) จับกับตัวรับ angiotensin converting enzyme 2 (ACE-2) ของ

เซลล์มนุษย์ และส่วน S2 ทำหน้าที่ในการรวมตัวของอนุภาคไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์⁽⁵⁾

ในผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ร่างกายจะตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนต่างๆ ของไวรัส ซึ่งมีรายงานพบแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อโปรตีน S และ N สูงกว่าโปรตีนโครงสร้างส่วนอื่นในผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2⁽⁶⁻⁸⁾ และพบแอนติบอดีต่อ RBD ในปริมาณที่สูงกว่าแอนติบอดีต่อส่วน S1 และ S2⁽⁹⁾ ปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 ที่ขึ้นทะเบียนและใช้เป็นวัคซีนในประชากรไทยแล้วมีหลายรูปแบบ ได้แก่ วัคซีนเชื้อตาย เช่น Sinovac และ Sinopharm วัคซีน adenovirus-based เช่น AstraZeneca วัคซีน mRNA เช่น Pfizer และ Moderna⁽¹⁰⁾ วัคซีนทุกชนิดสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน S หรือ RBD⁽¹¹⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน RBD เป็นเป้าหมายสำคัญในการตรวจภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการติดเชื้อ SARS-CoV-2 และที่เกิดขึ้นจากการได้รับวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 รวมทั้งการตรวจหาแอนติบอดีที่ลดล้างฤทธิ์ของไวรัส (neutralizing antibody) ซึ่งปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน RBD สัมพันธ์กับระดับการป้องกันการติดเชื้อ^(12, 13) ดังนั้นการตรวจแอนติบอดีต่อโปรตีน RBD จึงมีประโยชน์ในการตรวจการติดเชื้อ ตรวจการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันภายหลังการได้รับวัคซีน การศึกษาติดตามระดับแอนติบอดีที่ระยะเวลาต่างๆ และการศึกษาทางระบาดวิทยา ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการบริหารจัดการวัคซีนและการวางแผนทางสาธารณสุขที่เหมาะสมเพื่อควบคุมการระบาดของโรคโควิด-19^(6-9, 11)

วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส SARS-CoV-2 ชนิด binding antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นจากการได้รับเชื้อหรือการได้รับวัคซีน โดยใช้หลักการ immunoassay ที่เกิดจากปฏิกิริยา

จับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเชื้อ แบ่งการตรวจแอนติบอดีชนิดนี้เป็น 3 วิธี ได้แก่ วิธี lateral flow immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay และ chemiluminescence microparticle immunoassay ซึ่ง lateral flow immunoassay เป็นวิธีการตรวจเชิงคุณภาพที่ให้ผลบวกหรือผลลบ ตัวอย่างตรวจมีทั้งเลือดจากปลายนิ้ว ชีรุมหรือพลาสมา และมีการพัฒนาเป็นชุดตรวจขนาดเล็กซึ่งมีรูปแบบเป็นตลับที่ภายในบรรจุแผ่นเมมเบรนที่มีคอนจูเกตซึ่งเป็นแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารมีสีซึ่งถูกตรึงไว้ที่บริเวณแถบคอนจูเกต เมื่อสิ่งส่งตรวจที่มีแอนติบอดีเคลื่อนที่ผ่านแล้วทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารมีสี แล้วเคลื่อนที่ไปจับกับแอนติบอดีที่บริเวณแถบทดสอบทำให้เกิดแถบสีแดง ชุดตรวจแบบรวดเร็วมีชุดตรวจหาแอนติบอดีแบบแยกชนิด IgG IgM และแบบตรวจหาแอนติบอดีรวม ส่วน enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA หรืออีไลซา) เป็นวิธีตรวจในห้องปฏิบัติการซึ่งสามารถตรวจได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ตัวอย่างตรวจเป็นชีรุมหรือพลาสมา โดยใช้โปรตีนของตัวเชื่อมมาเคลือบในหลุมทดสอบ จากนั้นนำตัวอย่างจากผู้ป่วยมาบ่มกับแอนติเจนดังกล่าวในหลุมทดสอบ ถ้าในตัวอย่างของผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อไวรัส SARS-CoV-2 จะจับกับโปรตีนแอนติเจนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของแอนติเจนและแอนติบอดี หลังจากนั้นจะจับกับแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งสามารถย่อยสารซับสเตรทให้เป็นสารมีสีและตรวจโดยวัดการดูดกลืนแสง วิธีอีไลซานี้สามารถตรวจหาแอนติบอดีได้แบบแยกชนิด IgG IgM IgA และแบบตรวจหาแอนติบอดีรวม และ chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) เป็นวิธีการตรวจแบบเชิงปริมาณ ตัวอย่างตรวจเป็นชีรุมหรือพลาสมา หลักการคล้าย ELISA แต่มัก

เคลือบโปรตีนของไวรัสบน microparticle หรือ solid phase เมื่อผสมกับตัวอย่างตรวจ และแอนติบอดีจำเพาะตัวที่ 2 ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารซับสเตรทแล้วได้ผลิตผลที่เรืองแสง ปริมาณแสงที่ปล่อยออกมาจากปฏิกิริยามีความสัมพันธ์กับปริมาณของแอนติบอดีที่มีอยู่ในตัวอย่างตรวจ วิธีทดสอบนี้สามารถตรวจหาแอนติบอดีได้ทั้งแบบแยกชนิด IgG IgM IgA และแบบตรวจหาแอนติบอดีรวมได้เช่นกัน⁽¹⁴⁾

ดังนั้นสำหรับการทดสอบเชิงปริมาณที่ต้องการผลการทดสอบที่มีความถูกต้องสูงสามารถเลือกใช้วิธีอีไลซาหรือวิธี CMIA ขึ้นกับความพร้อมในด้านต่างๆ ของห้องปฏิบัติการ โดยวิธี CMIA ต้องใช้ชุดทดสอบจากบริษัทและใช้เครื่องมือแบบอัตโนมัติในการทดสอบและอ่านผล ส่วนวิธีอีไลซาสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่มีเครื่องอ่านผลซึ่งสามารถใช้ชุดทดสอบจากบริษัทหรือสามารถพัฒนาวิธีขึ้นใช้เองภายในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามชุดตรวจอีไลซาที่จำหน่ายอยู่ในปัจจุบันมีราคาค่อนข้างสูงจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยที่มีการทดสอบกับตัวอย่างจำนวนมาก แต่เนื่องจากวิธีอีไลซาเป็นเทคโนโลยีพื้นฐานที่ไม่ซับซ้อน วัสดุคิบบราคาถูกรวมทั้งสามารถใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้จึงควรมีการพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีอีไลซาสำหรับตรวจแอนติบอดีชนิด IgG ต่อโปรตีน RBD ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เพื่อใช้ในการตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative) เชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) และเชิงปริมาณ (quantitative) ในตัวอย่างชีรุมหรือพลาสมาของผู้ติดเชื้อหรือผู้รับวัคซีน ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาภูมิคุ้มกันเพื่อการควบคุมและป้องกันโรคโควิด-19 ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การสร้างและผลิตโปรตีน RBD ของไวรัส SARS-CoV-2

เริ่มจากการเพิ่มปริมาณยีนที่ใช้ในการสร้างโปรตีนส่วน spike RBD ในตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน R319 ถึง F541 ของไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ wild type (Wuhan-Hu-1) จากพลาสมิด pCMV3-SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike S1 Gene ORF cDNA clone (Codon Optimized) (Sinobiological, China) โดยวิธี PCR จากนั้นโคลนยีนส่วน spike RBD เข้าสู่พลาสมิด pcDNA3.4TM (Thermo Fisher Scientific, USA) ที่ถูกดัดแปลงให้บรรจุยีนส่วน IgG leader sequence และ rabbit IgG Fc (rFc) จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสม pcDNA 3.4TM-2019-nCoV-Spike RBD-rFc เข้าสู่เซลล์ FreeStyleTM293-F cell (Thermo Fisher Scientific, USA) ด้วยน้ำยา FectoPRO[®] transfection reagent (Polyplus-transfection[®], France) และเพาะเลี้ยงเซลล์โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาแยกโปรตีนลูกผสมส่วน spike RBD ที่เซลล์สร้างขึ้นให้มีความบริสุทธิ์ด้วย protein G affinity chromatography ทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration และวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA (bicinchoninic acid) assay จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจความจำเพาะด้วยวิธี Western blot ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

2. การพัฒนาวิธีอิมูโนโบลอต

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีอิมูโนโบลอตสำหรับตรวจแอนติบอดีต่อโปรตีน RBD ของเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งได้วิธีที่เหมาะสมดังนี้ เติมน้ำโปรตีน

RBD ที่ละลายในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) พีเอช 7.0 ปริมาณ 0.02 ไมโครกรัมต่อ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในเพลทอิมูโนโบลอตแบบ MAXISORP ชนิดกันแบน (Thermo Scientific, Denmark) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายออกจากเพลทแล้วเติม blocking buffer (skim milk ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายใน PBS ผสม Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายออกจากเพลท จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่เจือจาง 1:200 ในสารละลาย diluent (skim milk ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายใน PBS ผสม Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยแต่ละเพลทอิมูโนโบลอตที่ทดสอบให้ลง positive control serum กับ negative control serum ที่เจือจาง 1:200 และ skim milk ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (negative control system) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทด้วยสารละลาย wash buffer (สารละลาย PBS ผสม Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 รอบ แล้วเติม polyclonal rabbit anti-human IgG/HRP (Dako, Denmark) ที่เจือจาง 1:10,000 ในสารละลาย diluent โดยเติมปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยสารละลาย wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 5 รอบ จากนั้นเติมสารละลาย TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) peroxidase substrate (sera care, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด เติมน้ำสารละลาย stop solution (สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ต่อหลุม จากนั้นนำเพลทไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450/570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (TECAN microplate reader, Switzerland) ภายในระยะเวลา 30 นาที

คำนวณค่า ELISA index โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ทหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมผลลบ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ELISA index} = \text{OD}_{450/570} \text{ ของตัวอย่าง} / \text{OD}_{450/570} \text{ ของตัวควบคุมผลลบ}$$

คำนวณค่า cut-off โดยนำค่าเฉลี่ยของค่า ELISA index ของตัวอย่างที่เป็นผลลบ ซึ่งเก็บตัวอย่างก่อนมีการระบาดของโรคโควิด-19 จำนวน

228 ตัวอย่าง บวกด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคูณสองหรือสาม ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{cut-off} = X + 2SD \text{ หรือ } \text{cut-off} = X + 3SD$$

3. การประเมินคุณภาพวิธีทดสอบ

3.1 การหาค่าความจำเพาะ (specificity)

นำตัวอย่างซีรัมที่เก็บภายหลังการระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 จากผู้ตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยวิธี CMIA ได้ผลเป็นลบจำนวน

228 ตัวอย่าง มาหาค่าความจำเพาะโดยคำนวณจากสัดส่วนของตัวอย่างลบจริง (true negative) ทหารด้วยผลรวมของตัวอย่างลบจริงรวมกับตัวอย่างบวกปลอม (false positive) ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{specificity} = 100 \times [\text{true negative}/(\text{true negative} + \text{false positive})]$$

3.2 การหาค่าความไว (sensitivity)

นำตัวอย่างซีรัมของผู้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธี CMIA มาหาค่าความไวโดยคำนวณจากสัดส่วนของตัวอย่าง

บวกจริง (true positive) ทหารด้วยผลรวมของตัวอย่างบวกจริงรวมกับตัวอย่างลบปลอม (false negative) โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 173 ตัวอย่าง คำนวณดังสมการต่อไปนี้

$$\text{sensitivity} = 100 \times [\text{true positive}/(\text{true positive} + \text{false negative})]$$

3.3 การทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)

นำสารรบกวนปฏิกิริยาเติมลงในตัวอย่างผลบวกและผลลบด้วยวิธี CMIA โดยให้มีปริมาณความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซีโมโกลบิน ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไตรกลีเซอไรด์ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ รูมาตอยด์แฟกเตอร์ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ตัวอย่างผลบวกและผลลบชนิดละ 4

ตัวอย่าง จากนั้นทดสอบด้วยวิธีไลซาโดยเจือจางตัวอย่างที่ 1:200 วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย two-way analysis of variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism version 9.1.1 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบเติมสารรบกวนปฏิกิริยากับกลุ่มควบคุมด้วย Dunnett's multiple comparisons test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยกำหนด p value มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

3.4 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity)

นำตัวอย่างซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อโรคต่าง ๆ ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้แก่ influenza virus (3 ตัวอย่าง) measles virus (10 ตัวอย่าง) mumps virus (10 ตัวอย่าง) mycoplasma (2 ตัวอย่าง) respiratory syncytial virus (1 ตัวอย่าง) Japanese encephalitis virus (1 ตัวอย่าง) enterovirus (10 ตัวอย่าง) hepatitis C virus (5 ตัวอย่าง) human immunodeficiency virus (5 ตัวอย่าง) และโรค autoimmune (3 ตัวอย่าง) มาทดสอบด้วยวิธีอ็ไลซาโดยเจือจางตัวอย่างที่ 1:200

4. การตรวจหาปริมาณแอนติบอดี

4.1 การตรวจเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative)

นำสารมาตรฐานปฐมภูมิ (primary standard) ของ WHO (NIBSC รหัส 20/136) ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของ binding antibody unit (BAU) เท่ากับ 1,000 BAU ต่อมิลลิลิตร มาเติมลงในตัวควบคุมผลลบ ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 125 BAU ต่อ มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อเนื่องแบบสองเท่าจนถึงความเข้มข้น 3.91 BAU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาเจือจางด้วยสารละลาย diluent ที่ 1:200 แล้วทดสอบด้วยวิธีอ็ไลซา คำนวณค่า ELISA index แล้วนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า ELISA index กับค่าความเข้มข้นในช่วง 3.91 ถึง 62.50 BAU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสมการความสัมพันธ์ที่ได้มาใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของตัวอย่างจากค่า ELISA index

4.2 การตรวจเชิงปริมาณ (quantitative)

นำสารมาตรฐานปฐมภูมิ NIBSC รหัส 20/136 มาเจือจางที่ค่าต่าง ๆ โดยใช้สารละลาย diluent แล้วทดสอบด้วยวิธีอ็ไลซา จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และค่าความเข้มข้น (BAU ต่อมิลลิลิตร) นำสมการความสัมพันธ์ที่ได้มาใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง จากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดสอบอ็ไลซา ที่ค่าเจือจางที่เหมาะสม

5. การหาค่าความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างวิธีอ็ไลซากับวิธี CMIA

ตัวอย่างซีรัมผ่านการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยใช้ชุดตรวจหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) รุ่น SARS-CoV-2 IgG II Quant assay (Abbott) ในหน่วย AU ต่อมิลลิลิตร แปลงเป็นหน่วย BAU ต่อมิลลิลิตร โดยคูณด้วยค่าแฟกเตอร์ 0.143

นำตัวอย่างซีรัมของผู้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ตรวจวิธี CMIA แล้วให้ผลเป็นบวกและมีค่าปริมาณแอนติบอดีในหน่วย BAU ต่อมิลลิลิตร จำนวน 173 ตัวอย่าง มาทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีอ็ไลซา และคำนวณหาปริมาณแอนติบอดีโดยใช้สมการของกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานปฐมภูมิ NIBSC รหัส 20/136 ซึ่งได้ค่าเป็นหน่วย BAU ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกันกับค่าแอนติบอดีที่วัดโดยวิธี CMIA จากนั้นนำค่าแอนติบอดีของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีอ็ไลซาและวิธี CMIA มาสร้างกราฟ แล้วคำนวณค่าความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson's correlation วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม GraphPad Prism version 9.1.1

6. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างของการวิจัยครั้งนี้คือตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่ประกอบด้วย

ตัวอย่างควบคุมผลบวก เป็นตัวอย่างพลาสมาของผู้ที่หายป่วยจากโรคโควิด-19 ซึ่งเก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2563 และตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยวิธี CMIA ได้ผลเป็นบวก จำนวน 1 ราย ใช้สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีอีไลซาและใช้เป็นตัวอย่างควบคุมผลบวกในการทดสอบวิธีอีไลซา ตัวอย่างผลบวก ได้แก่

1. ตัวอย่างซีรัมของผู้ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 ชนิด Sinovac จำนวน 2 ครั้ง (SS) ซึ่งตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยวิธี CMIA ได้ผลเป็นบวกจำนวน 18 ราย ใช้สำหรับการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีอีไลซา

2. ตัวอย่างซีรัมของผู้ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 ซึ่งได้รับการฉีดวัคซีนรูปแบบต่างๆ ดังนี้ Sinovac AstraZeneca (SA), Sinovac Sinovac AstraZeneca (SSA), AstraZeneca AstraZeneca (AA) และ Sinovac Sinovac Pizer (SSP) ที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2564 ซึ่งตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยวิธี CMIA ได้ผลเป็นบวก จำนวน 173 ตัวอย่าง ใช้สำหรับประเมินคุณภาพวิธีอีไลซา และตัวอย่างผลลบ ได้แก่

1. ตัวอย่างซีรัมที่เก็บก่อนปี พ.ศ. 2563 หรือก่อนการระบาดของโรคโควิด-19 ซึ่งมีผลเป็นลบโดยการตรวจด้วยวิธีอีไลซาสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของไวรัส SARS-CoV-2 จำนวน 124 ตัวอย่าง ใช้สำหรับทดสอบหาค่า cut-off ของวิธีอีไลซา

2. ตัวอย่างซีรัมของกลุ่มคนสุขภาพดี ไม่มีประวัติเข้าเกณฑ์สอบสวนโรค และไม่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 เก็บตัวอย่างก่อนได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 ในปี พ.ศ. 2564 จำนวน 18 ราย ใช้สำหรับการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม

ของวิธีอีไลซา

3. ตัวอย่างซีรัมของกลุ่มคนสุขภาพดี ไม่มีประวัติเข้าเกณฑ์สอบสวนโรค และไม่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 เก็บตัวอย่างก่อนได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 ในปี พ.ศ. 2564 และมีผลลบโดยการตรวจด้วยวิธี CMIA จำนวน 228 ตัวอย่าง ใช้สำหรับประเมินคุณภาพวิธีอีไลซา

โดยการศึกษานี้ได้รับการอนุมัติทางจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในมนุษย์ สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข ในโครงการวิจัยเรื่องโครงการวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้เพื่อรองรับการระบาดของโรคโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (COVID-19) (COA No. IHRP2020056) อนุมัติวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2563 ถึงปีงบประมาณ 2565

ผลการวิจัย

1. การสร้างและผลิตโปรตีน RBD ของไวรัส SARS-CoV-2

โปรตีน RBD ของไวรัส SARS-CoV-2 เป็นโปรตีนลูกผสมซึ่งมีการแสดงออกในเซลล์ Free-Style™ 293-F ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้และหลั่งออกมาอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยสามารถผลิตและแยกโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์ได้ในปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อลิตรของการเพาะเลี้ยง จากการตรวจสอบคุณลักษณะของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีน RBD ที่ได้มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 50.7 กิโลดัลตัน ซึ่งเป็นขนาดโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณโปรตีน RBD ขนาด 25.1 กิโลดัลตัน รวมกับโปรตีน Fc ขนาด 25.6 กิโลดัลตัน เนื่องจากโปรตีน RBD เป็นไกลโคโปรตีน จึงเกิดกระบวนการ glycosylation ทำให้มีขนาดโมเลกุลเพิ่มขึ้นได้เล็กน้อย⁽¹⁵⁾ และพบว่าโปรตีนมีความจำเพาะกับแอนติบอดีต่อส่วน Fc tag ที่ใช้ในการติดตามการแสดงออกของโปรตีน (Fig. 1)

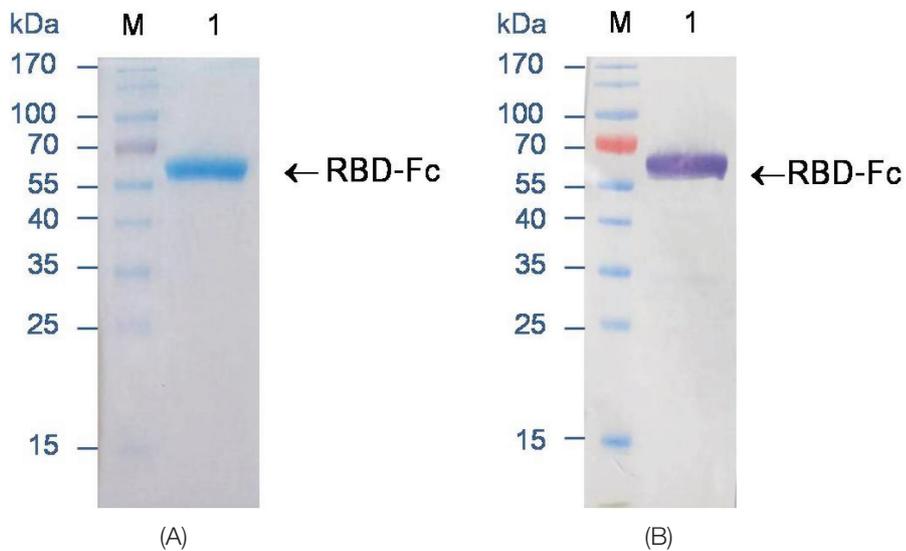


Fig. 1 Characterization of the RBD-Fc recombinant protein by SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) Lane M: Protein ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), Lane 1: purified recombinant SARS-CoV-2 RBD protein.

2. สภาวะที่เหมาะสมของวิธีอิมูโนโบลอต

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีอิมูโนโบลอต โดยใช้ตัวอย่างของผู้ได้รับวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 ทั้งก่อนฉีดและหลังฉีดวัคซีนจำนวน 18 ราย และตัวอย่างผู้หายป่วยจากโรคโควิด-19 จำนวน 1 ราย โดยการศึกษากิจกรรมโปรตีน RBD ค่าเจือจางตัวอย่าง และความเข้มข้นของแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) เป็นต้น จากนั้นนำสภาวะที่ได้มาใช้ในการศึกษาเพื่อหาค่า cut-off ของผลลบ โดยหาได้จากการคำนวณค่า ELISA index โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมผลลบ คำนวณค่า cut-off โดยนำค่าเฉลี่ยของค่า ELISA index ของตัวอย่างที่เป็นผลลบจำนวน 124 ตัวอย่าง บวกด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคูณสอง ซึ่งคำนวณได้จากค่า ELISA index ที่ 0.6875 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.3786 จึงได้ค่า cut-off เท่ากับ 1.4447 และเมื่อคิดที่ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคูณสามจะได้ค่า cut-off เท่ากับ 1.8232

3. การประเมินคุณภาพวิธีทดสอบ

3.1 ค่าความจำเพาะ (specificity)

หาค่าความจำเพาะโดยนำตัวอย่างซีรัมที่เก็บภายหลังจากระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 จากผู้ตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยวิธี CMIA ได้ผลเป็นลบจำนวน 228 ตัวอย่าง มาทดสอบโดยวิธีอิมูโนโบลอตแล้วหาค่าความจำเพาะโดยคำนวณจากสัดส่วนของตัวอย่างลบจริง หารด้วยผลรวมของตัวอย่างลบจริงรวมกับตัวอย่างบวกปลอม คิดค่าความจำเพาะโดยใช้ค่า cut-off ที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ ELISA index รวมกับสองเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานซึ่งเท่ากับ 1.4447 ได้ผลบวกปลอมจำนวน 14 ตัวอย่าง ซึ่งคำนวณได้ค่าความจำเพาะร้อยละ 93.86 หรือคิดค่าความจำเพาะที่ค่า cut-off ที่คิดจากค่าเฉลี่ยของ ELISA index รวมกับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานซึ่งเท่ากับ 1.8232 ได้ผลบวกปลอมจำนวน 4 ตัวอย่าง จึงคำนวณได้ค่าความจำเพาะร้อยละ 98.25 (Table 1)

Table 1 Specificity (%) at cut-off value of 1.4447 and 1.8232

Cut-off value	Number of true negatives/ Number of true negatives plus false positives	Specificity (%)
1.4447 (mean _{ELISA index} + 2SD)	14/228	93.86
1.8232 (mean _{ELISA index} + 3SD)	4/228	98.25

3.2 ค่าความไว (sensitivity)

หาค่าความไวโดยนำตัวอย่างซีรัมของผู้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ให้ผลเป็นบวกโดยวิธี CMIA มาหาค่าความไวโดยคำนวณจากสัดส่วนของตัวอย่างบวกจริงหารด้วยผลรวมของตัวอย่าง

บวกจริงรวมกับตัวอย่างลบปลอม โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 173 ตัวอย่าง โดยพบว่าเมื่อทำการทดสอบโดยวิธีอิมมูโนแอสซายแล้วให้ผลบวกทั้ง 173 ตัวอย่าง มีค่า cut-off ที่ 1.4447 และ 1.8232 จึงคำนวณได้ค่าความจำเพาะที่ร้อยละ 100 ที่ cut-off ทั้งสองค่า (Table 2)

Table 2 Sensitivity (%) at cut-off value of 1.4447 and 1.8232

Cut-off value	Number of true positives/ Number of true positives plus false negatives	Sensitivity (%)
1.4447 (mean _{ELISA index} + 2SD)	0/173	100
1.8232 (mean _{ELISA index} + 3SD)	0/173	100

3.3 ทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)

จากผลการทดสอบสมมติฐานของสารรบกวนปฏิกิริยาต่อผลการทดสอบอิมมูโนแอสซายของตัวอย่างผลลบ และตัวอย่างผลบวก พบว่าบิลิรูบินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซีโมโกลบินความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไตรกลีเซอไรด์ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรูมาตอยด์แฟกเตอร์ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการทดสอบดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ใส่สารรบกวนปฏิกิริยา (Fig. 2)

3.4 ทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity)

ใช้ตัวอย่างซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ influenza virus, measles virus, mumps virus, influenza A virus, mycoplasma, respiratory syncytial virus, Japanese encephalitis virus, enterovirus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus และโรค autoimmune มาทดสอบด้วยวิธีอิมมูโนแอสซาย

ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ค่า cut-off ที่ 1.4447 ตรวจพบปฏิกิริยาข้ามจากตัวอย่าง โรคติดเชื้อ enterovirus จำนวน 2 ตัวอย่าง และโรค autoimmune จำนวน 1 ตัวอย่าง จากจำนวนรวม 50 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6 แต่เมื่อใช้ค่า cut-off ที่ 1.8232 ตรวจไม่พบปฏิกิริยาข้าม คิดเป็นร้อยละ 0

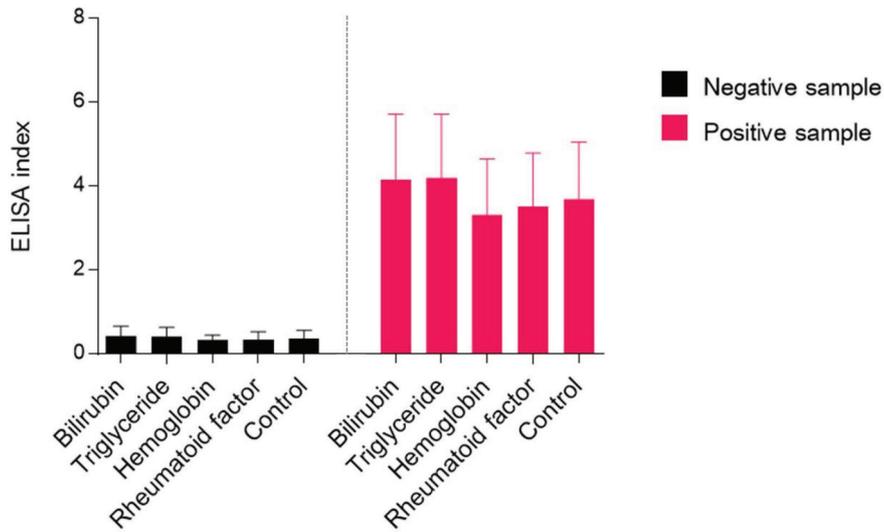


Fig. 2 Comparison of interference against anti-SARS-CoV-2-RBD antibody between negative samples (black) and positive samples (pink) at different levels of ELISA index with statistically significance by Pearson’s correlation ($p < 0.05$).

4. การตรวจหาปริมาณแอนติบอดี

4.1 การตรวจเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative)

ในการทดสอบเชิงกึ่งปริมาณพบว่าสามารถหาค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีได้จากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน NIBSC รหัส 20/136 ที่เจือจางที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 3.91, 7.81, 15.63, 31.25 และ 62.5 BAU ต่อมิลลิลิตร แล้วเติมลงในตัวอย่างควบคุมผลลบ ซึ่งกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า ELISA index กับค่าความเข้มข้น (BAU ต่อมิลลิลิตร) (Fig. 3) โดยมีสมการดังนี้

$$\text{ELISA index} = (0.0233 \times \text{ความเข้มข้น}) + 1.1906$$

โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.992

ซึ่ง limit of detection ของวิธีอิมูโนแอสซายในการตรวจเชิงกึ่งปริมาณ ที่ค่า cut-off 1.4447 จะเท่ากับค่าสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10.91 BAU ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ ELISA index 1.8232 เท่ากับสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 27.15 BAU ต่อมิลลิลิตร

4.2 การตรวจเชิงปริมาณ (quantitative)

คำนวณหาปริมาณแอนติบอดีได้จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการนำสารมาตรฐานปฐมภูมิ NIBSC รหัส 20/136 มาเจือจางในสารละลาย diluent ที่ค่าความเข้มข้น 0.16, 0.20, 0.40, 0.67, 1.00, 1.25, 1.63, 2.00 และ 2.50 BAU ต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบด้วยวิธีอิมูโนแอสซาย จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) และค่าความเข้มข้น (BAU ต่อมิลลิลิตร) ต่างๆ โดยใช้โปรแกรม excel (Fig. 4) ซึ่งได้สมการดังนี้

$$\text{OD}_{450/570} = 0.5879 \ln(\text{ความเข้มข้น}) + 1.3597$$

โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9934

ซึ่งสามารถใช้ช่วง OD ระหว่าง 0.2974 -1.9468 มาคำนวณค่าความเข้มข้นได้ระหว่าง 0.16-2.50 BAU ต่อมิลลิลิตร

นำสมการความสัมพันธ์ที่ได้มาใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของตัวอย่างจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดสอบอิมูโนแอสซายที่ค่าเจือจางที่เหมาะสม

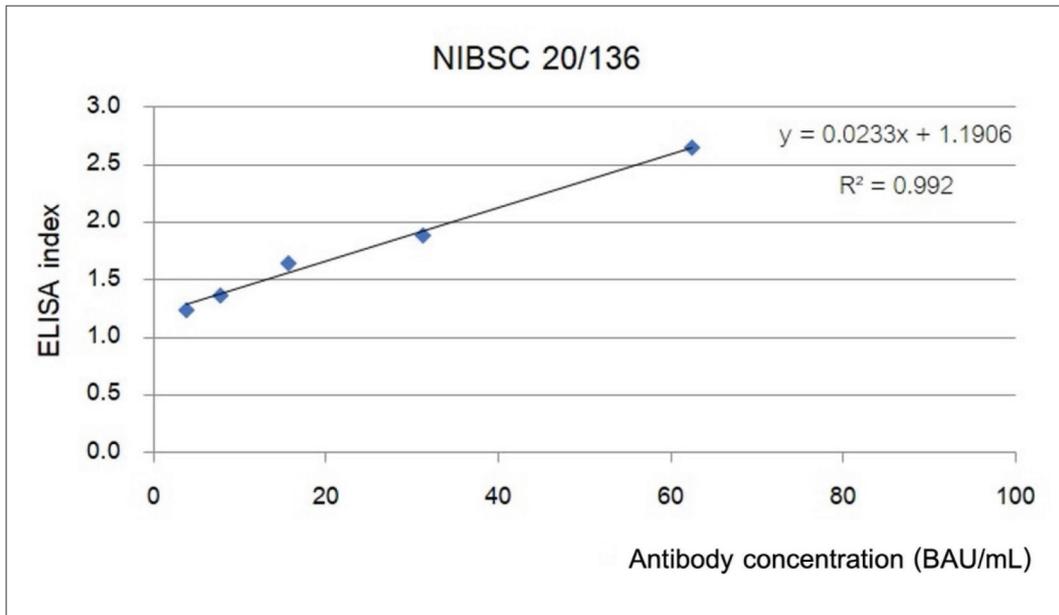


Fig. 3 ELISA standard curve of anti-SARS-CoV-2-RBD antibody (NIBSC code 20/136) showing a relation between ELISA index and antibody concentration (BAU/mL). The equation was $y = 0.0233x + 1.1906$ with $R^2 = 0.992$.

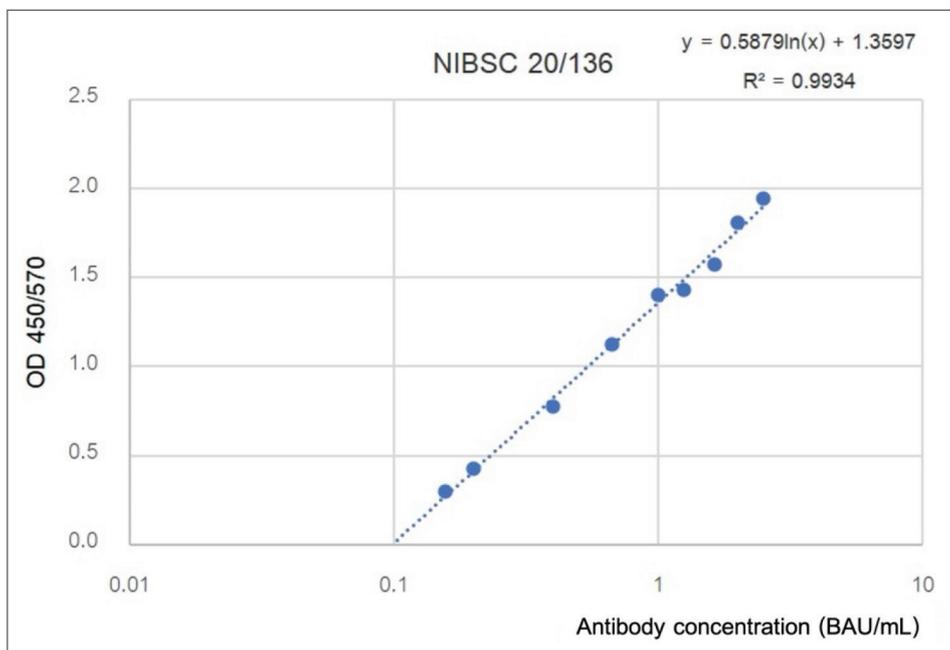


Fig. 4 ELISA standard curve of anti-SARS-CoV-2-RBD antibody (NIBSC code 20/136) showing a relation between $OD_{450/570}$ and antibody concentration (BAU/mL). The equation was $y = 0.5879\ln(x) + 1.3597$ with $R^2 = 0.9934$.

5. การหาค่าความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างวิธีเฝ้าระวังโรคกับวิธี CMIA

ผลการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างวิธีเฝ้าระวังโรคกับวิธี CMIA โดยใช้ตัวอย่างผลบวกจำนวน 173 ตัวอย่าง ที่ผ่านการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน spike ด้วยวิธี CMIA มาทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีเฝ้าระวังโรค จากนั้นคำนวณหาปริมาณแอนติบอดีโดยใช้สมการของกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานปฐมภูมิ NIBSC รหัส 20/136 ซึ่งได้ค่าเป็น

หน่วย BAU ต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าแอนติบอดีที่วัดโดยวิธี CMIA ในหน่วย AU ต่อมิลลิลิตร แปลงเป็นหน่วย BAU ต่อมิลลิลิตร โดยคูณด้วยค่าแฟกเตอร์ 0.143 จากนั้นนำค่าแอนติบอดีของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีเฝ้าระวังโรคและวิธี CMIA มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ โดยใช้สถิติ Pearson's correlation (Fig. 5) และพบว่ามีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวิธีเฝ้าระวังโรคกับวิธี CMIA ($p < 0.001, r = 0.93$)

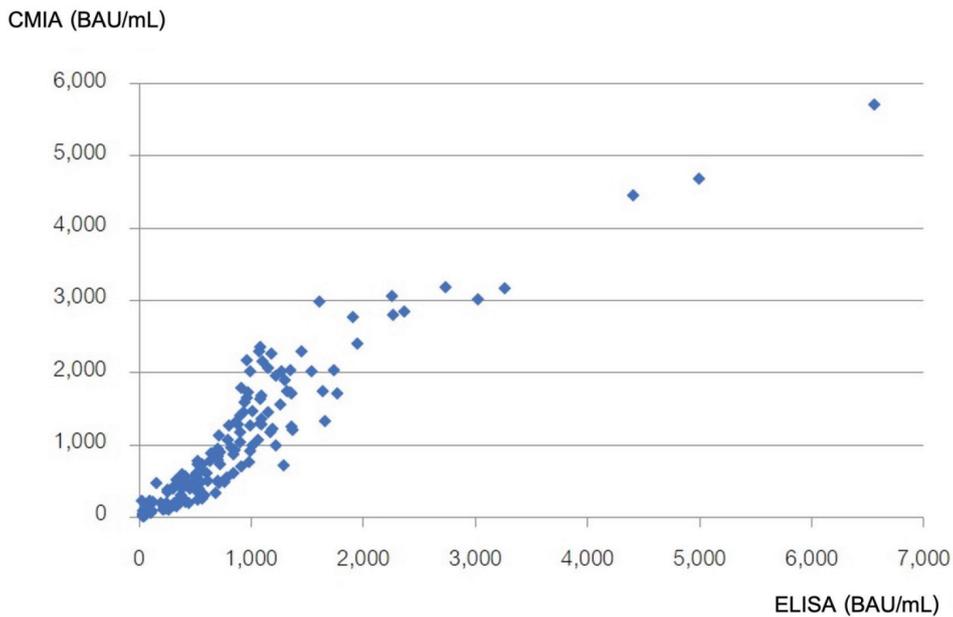


Fig. 5 Correlation of anti-SARS-CoV-2-RBD antibody concentration (BAU/mL) between developed ELISA and CMIA. Statistical significance by Pearson's correlation ($p < 0.001, r = 0.93$).

วิจารณ์

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าวิธีเฝ้าระวังโรคที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน RBD ของเชื้อ SARS-CoV-2 ได้ปรับให้มีสภาวะที่เหมาะสม เช่น ลดปริมาณแอนติเจนที่เคลือบเพลทโดยใช้โปรตีน RBD ที่ 20 นาโนกรัมต่อหลุม แต่ในรายงานการศึกษาอื่นพบว่าใช้ที่ 50 นาโนกรัม⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

ดังนั้นที่ปริมาณ RBD เท่ากันจะสามารถใช้ทดสอบกับตัวอย่างได้จำนวนมากกว่า นอกจากนี้ได้ลดความเข้มข้นของ anti-human IgG/HRP โดยเจือจางที่ 1:10,000 รวมทั้งลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน เช่น ลดขั้นตอนการล้างเพลทหลังการเคลือบด้วยโปรตีน RBD และหลังจากบ่มด้วยสารละลาย blocking buffer ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบ แต่ทำให้

ระยะเวลาในการทำงานสั้นลงและลดปริมาณสารละลายที่เกี่ยวข้อง

ในการหาค่า cut-off ซึ่งคำนวณได้จากค่า ELISA index รวมค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสองเท่าและสามเท่าแล้วได้ค่า cut-off เท่ากับ 1.4447 และ 1.8232 ตามลำดับ และเมื่อนำค่า cut-off ไปหาค่าความจำเพาะโดยทดสอบกับตัวอย่างผลลบ พบว่าเมื่อใช้ค่า cut-off 1.4447 ให้ค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 93.86 และที่ cut-off 1.8232 ให้ค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 98.25 แสดงว่าเมื่อใช้ค่า cut-off ที่ 1.8232 ให้ค่าความจำเพาะสูงกว่าที่ค่า 1.4447 และถ้าทำการทดสอบกับตัวอย่างผลลบจำนวนเพิ่มมากขึ้น อาจทำให้มีค่า cut-off ที่สูงขึ้นและทำให้ค่าความจำเพาะเพิ่มขึ้น และเมื่อนำค่า cut-off ไปหาค่าความไว โดยทดสอบกับตัวอย่างผลบวกพบว่าค่า cut-off ทั้งสองค่ามีค่าความไวเท่ากันที่ร้อยละ 100 จากการศึกษาค้นคว้าของสารบรรณปฏิภิกิริยา ได้แก่ บิลิรูบิน ฮีโมโกลบิน ไตรกลีเซอไรด์ และ รูมาตอยด์แฟกเตอร์ พบว่าสารดังกล่าวไม่มีผลต่อการทดสอบ ในขณะที่พบการเกิดปฏิภิกิริยาข้ามจากโรคติดเชื้อ enterovirus และ โรค autoimmune เมื่อใช้ค่า cut-off ที่ 1.4447 แต่เมื่อใช้ค่า cut-off ที่ 1.8232 ตรวจไม่พบปฏิภิกิริยาข้าม ดังนั้นวิธีทดสอบนี้สามารถใช้ค่า cut-off ในการแยกความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบ แต่วิธีทดสอบนี้มีข้อจำกัดของการวัด (detection limit) ที่เกิดจากการรบกวนปฏิภิกิริยา เช่น โรคติดเชื้อบางชนิด โรค autoimmune และอาจเกิดจากสารรบกวนปฏิภิกิริยาอื่นจากตัวอย่างเอง ดังนั้นสามารถเลือกใช้ค่า cut-off ที่สูงขึ้นเพื่อเพิ่มค่าความจำเพาะของการทดสอบ

นอกจากนี้ พบว่าสามารถคำนวณปริมาณแอนติบอดีออกมาในหน่วยสากล (BAU ต่อมิลลิลิตร) โดยการเทียบค่ากับสารมาตรฐาน โดยพบว่าวิธีอีไลซาที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการหาปริมาณแอนติบอดีในช่วงความเข้มข้นใกล้เคียงกับชุดทดสอบอีไลซา

ยี่ห้ออื่น ๆ^(19, 20) อย่างไรก็ตามไม่ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับชุดทดสอบอีไลซาอื่น จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษานี้ และพบว่าวิธีอีไลซานี้ให้ผลปริมาณแอนติบอดีสัมพันธ์กับวิธี CMIA ที่ใช้ชุดทดสอบซึ่งได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา เพื่อใช้ในสถานการณ์ฉุกเฉินที่มีการระบาดของโรคโควิด-19 พบว่ามีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวิธี ELISA และวิธี CMIA ($p < 0.001$, $r = 0.93$)

สำหรับการทดสอบด้วยวิธีอีไลซาที่แสดงผลเชิงกึ่งปริมาณมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้น สามารถรองรับการตรวจตัวอย่างจำนวนมากเนื่องจากได้เจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นเดียวที่ 1:200 ซึ่งสามารถแสดงผลความแตกต่างระหว่างผลลบและผลบวก โดยแสดงผลความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติบอดีต่ำที่อยู่ในช่วง 13.48 ถึง 62.5 BAU ต่อ มิลลิลิตร แต่สำหรับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงและต้องการผลค่าความเข้มข้นที่ถูกต้องจะต้องเจือจางตัวอย่างเพิ่มขึ้นหลายค่าเพื่อให้สามารถอ่านผลได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงปริมาณ

ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างผลบวกจากกลุ่มที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 และตัวอย่างควบคุมผลบวกจากผู้ที่ยังป่วยจากโรคโควิด-19 แสดงว่าวิธีตรวจที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีในผู้ได้รับการฉีดวัคซีนและผู้ติดเชื้อได้

สรุป

วิธีอีไลซาที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน RBD ของเชื้อ SARS-CoV-2 ในการตรวจเชิงคุณภาพของตัวอย่างที่เจือจาง 1:200 มีค่าจุดตัด (cut-off) จากตัวอย่างผลลบโดยใช้ค่าเฉลี่ยบวกค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสองเท่าและสามเท่าได้ค่า 1.4447 และ 1.8232 หน่วยอีไลซา ตามลำดับ โดย

มีค่าความจำเพาะร้อยละ 93.94 และ 98.27 ส่วนการตรวจผลบวกมีค่าความไวที่ร้อยละ 100 และพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามร้อยละ 6 และ 0 ที่ค่า cut-off 1.4447 และ 1.8232 ส่วนสารรบกวนปฏิกิริยาไม่มีผลกระทบต่อผลการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในการตรวจเชิงกึ่งปริมาณสามารถอ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 13.48-62.50 BAU ต่อมิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างที่เจือจาง 1:200 และสามารถตรวจปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงที่ต้องเจือจางมากกว่า 1:200 โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานสำหรับตรวจเชิงปริมาณ ในการศึกษาไม่ได้ทดสอบเปรียบเทียบผลการหาปริมาณแอนติบอดีระหว่างวิธีอ็โลซาที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบอ็โลซายี่ห้ออื่น แต่ได้เปรียบเทียบปริมาณแอนติบอดีกับวิธี CMIA และพบว่าวิธีอ็โลซาสามารถหาปริมาณแอนติบอดีโดยมีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการตรวจด้วย CMIA ($p < 0.001$, $r = 0.93$)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์และผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ รวมทั้งบุคลากรจากทั้งสองหน่วยงานที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

1. Wu F, Zhao S, Yu B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579: 265-9. doi:10.1038/s41586-020-2008-3
2. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) WHO Thailand Situation Report-31 August 2022. Geneva: World Health Organization; 2020 Available from: <https://www.who.int/thailand/emergencies/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
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. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
4. Chen, Y, Liu, Q, Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 2020; 92: 418-23. doi: 10.1002/jmv. 25681
5. Lan J, Ge J, Yu J, *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020; 581: 215-20. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5
6. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, *et al.* Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus -2: a narrative review. *Ann Intern Med* 2020; 172: 726-34. doi.org/10.7326/M20-1301
7. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, *et al.* Humoral immune response to SARS-CoV-2 in iceland. *N Engl J Med* 2020; 383: 1724-34. doi:10.1056/NEJMoa 2026116

8. Theel ES, Slev P, Wheeler S, *et al.* The role of antibody testing for SARS-CoV-2: Is There One? *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00797-20. doi:10.1128/JCM.00797-20
9. Brochot E, Demey B, Touze A, *et al.* Anti-spike, anti-nucleocapsid and neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 inpatients and asymptomatic individuals. *Front. Microbiol* 2020; 11: 584251. doi:10.3389/fmicb.2020.584251
10. Department of disease control (Thailand). [Internet]. Nonthaburi: The Department; 2021. Guideline for vaccine administration in COVID-19 epidemic 2021, 2nd edit; 2021 [cited 2022 Sep 2]; [about 106 screens]. Available from: <https://ddc.moph.go.th/vaccine-covid19/getFiles/11/1628849610213.pdf>
11. Kaur SP, Gupta V. COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. *Virus Research* 2020; 288:198114. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198114
12. Mehdi F, Chattopadhyay S, Thiruvengadam R, *et al.* Development of a fast SARS-CoV-2 IgG ELISA, based on receptor-binding domain, and its comparative evaluation using temporally segregated samples from RT-PCR positive individuals. *Front Microbio* 2021; 11: 618097. doi: 10.3389/fmicb.2020.618097
13. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, *et al.* The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol* 2020; 5: eabc8413. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413
14. Department of Medical Sciences (Thailand). [Internet]. Nonthaburi: The Department; 2021. Guideline for antibody detection of SARS-CoV-2 infection, 2021 [cited 2022 Jun 23]. Available from: https://www3.dmsc.moph.go.th/download/files/dmsc_sar.pdf
15. R&D systems [Internet]. Minneapolis: The Company; 2021. Application note: Glycosylation of the receptor binding domain of COVID-19 virus spike protein; 2021 [cited 2022 Sep 2]; [About 2 screens]. Available from: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/glycosylation-receptor-binding-domain-covid-19-virus-spike-protein>
16. Yuen RR, Steiner D, Pihl RMF, *et al.* Novel ELISA protocol links pre-existing SARS-CoV-2 reactive antibodies with endemic coronavirus immunity and age and reveals improved serologic identification of acute COVID-19 via multi-parameter detection. *Front Immunol* 2021; 12: 614676. doi: 10.3389/fimmu.2021.614676

17. Zak MM, Stock A, Stadlbauer D, *et al.* Development and characterization of a quantitative ELISA to detect anti-SARS-CoV-2 spike antibodies. *Heyon* 2021; 7: e08444. doi: 10.1016/j.heliyon. 2021. e08444
18. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med* 2020; 26: 1033-6. doi: 10.1038/s41591-020-0913-5
19. Proteintech [Internet]. Rosemont: The Company; 2022. Anti-SARS-CoV-2 S-RBD protein Human IgG ELISA Kit; 2022 [cited 2022 Aug 2]; [About 2 screens]. Available from: <http://www.ptglab.com/products/Virus-IgG-for-2019-nCoV-S-RBD-ELISA-Kit-KE30003.htm#product-information>
20. Antibodies-online.com [Internet]. Aachen: The Company; 2022. SARS-CoV-2 S1 subunit (RBD) IgG antibody ELISA kit; 2022 [cited 2022 Aug 2]; [About 3 screens]. Available from: <https://www.antibodies-online.com/kit/6952762/SARS-CoV-2+S1+Subunit+RBD+IgG+Antibody+ELISA+Kit/>