

การพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจ เชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจด้วยเทคนิค MassARRAY

ข้อมูลโดย วิกัยดา วรปิตรังสี

บทนำ

การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับโลก และเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตในกลุ่มประชากรที่มีความเปราะบาง เช่น เด็ก ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจมีความหลากหลายทั้งไวรัสและแบคทีเรีย และมักก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่ไม่จำเพาะและคล้ายคลึงกัน ส่งผลให้การวินิจฉัยจากอาการเพียงอย่างเดียวมีข้อจำกัด และจำเป็นต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีความถูกต้องและรวดเร็วปัจจุบัน

การตรวจด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา เช่น real-time PCR ถูกใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ อย่างไรก็ตาม การตรวจแบบ singleplex หรือ multiplex ที่มีจำนวนเป้าหมายจำกัดยังไม่สามารถครอบคลุมเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ทั้งหมด อีกทั้งการตรวจหลายปฏิกิริยายังเพิ่มระยะเวลา ต้นทุน และปริมาณตัวอย่างที่ต้องใช้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดต่อการตรวจวินิจฉัยและการเฝ้าระวังโรคในวงกว้าง

ด้วยเทคนิค MassARRAY มีศักยภาพในการตรวจเป้าหมายจำนวนมากพร้อมกันด้วยความไวและความจำเพาะสูง เทคนิคนี้จึงเหมาะสมสำหรับการพัฒนาชุดตรวจเชื้อก่อโรคแบบ multiplex ที่ต้องการความครอบคลุมและประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์

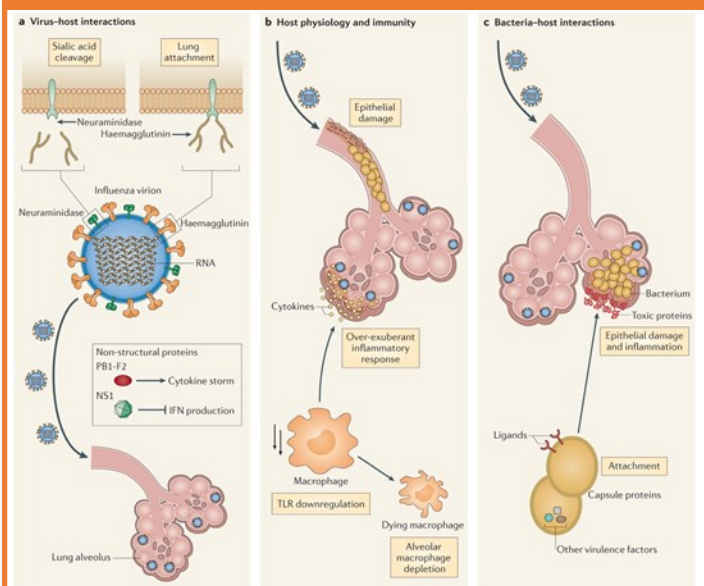
ดังนั้น การพัฒนาชุดตรวจเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจโดยใช้เทคนิค MassARRAY ซึ่งครอบคลุมเชื้อไวรัสที่สำคัญ 16 ชนิด รวมถึง SARS-CoV-2 (ยีน N และ ORF1ab), Influenza A และ B พร้อมชนิดย่อยที่สำคัญ, RSV subtype A และ B และ Rhinovirus A และ B รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินหายใจ 3 ชนิด ได้แก่ *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae* และ *Mycoplasma pneumoniae* ช่วยเพิ่มความรวดเร็วและความแม่นยำในการตรวจคัดกรอง สนับสนุนการรักษาที่เหมาะสม และช่วยให้การเฝ้าระวังโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

Respiratory
Viruses
16 Types

Bacterial
Pathogens
3 Types

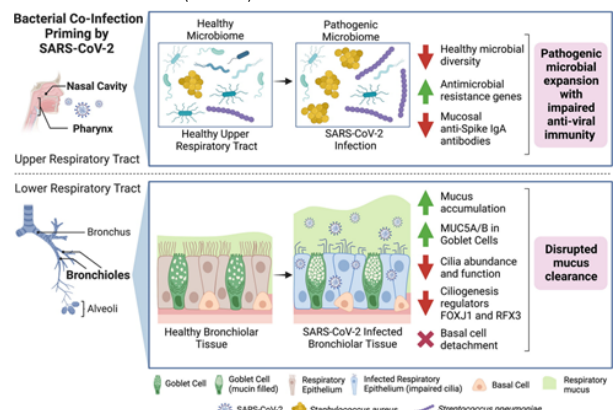
Human
Control gene

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัส โฮสต์ และแบคทีเรียในภาวะการติดเชื้อร่วมในระบบทางเดินหายใจ



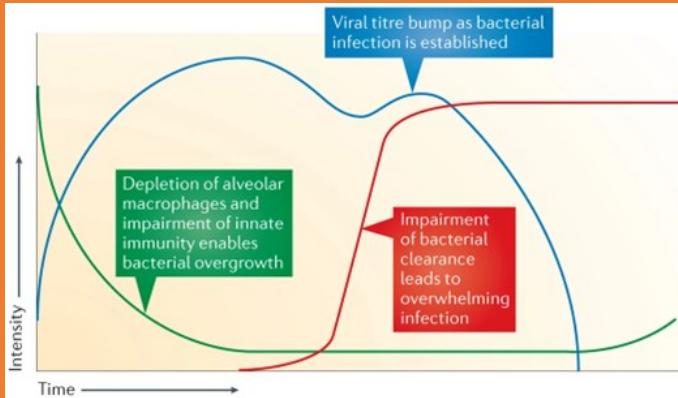
ภาพ 1

- ไวรัสระบบทางเดินหายใจสามารถเกาะและทำลายเซลล์ปอด รวมทั้งรบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้เชื้อแพร่กระจายลงสู่ปอดส่วนลึก และเอื้อต่อการเข้ายึดเกาะของแบคทีเรียในเนื้อปอด
- การติดเชื้อไวรัสทำให้เนื้อเยื่อปอดเสียหายและภูมิคุ้มกันอ่อนแอลง แบคทีเรียจึงเกาะ เติบโต และก่อการอักเสบได้ง่าย ส่งผลให้ปอดบาดเจ็บรุนแรงขึ้น
- แบคทีเรียบางชนิดใช้โอกาสนี้เพิ่มความรุนแรงของโรค โดยเกาะเซลล์ปอดที่เสียหายและสร้างสารพิษ ร่วมกับไวรัส ทำให้การติดเชื้อรุนแรงและรักษายากขึ้น (อ้างอิง)



ภาพ 2 กลไกที่การติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ทำให้ร่างกายเอื้อต่อการติดเชื้อแบคทีเรียร่วม โดยไวรัสส่งผลต่อการสร้างเมือกและการทำงานของเซลล์ในทางเดินหายใจ ทำให้แบคทีเรียเกาะและก่อโรคได้ง่ายขึ้น Ref (5)

ความสัมพันธ์ตามช่วงเวลาระหว่างระดับไวรัส ปริมาณแบคทีเรีย และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ในการติดเชื้อร่วมไวรัส-แบคทีเรีย



ภาพ 3 หลังการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ปริมาณไวรัสในปอดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงสุดภายใน 2-3 วัน ขณะเดียวกันภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะเซลล์ที่ทำหน้าที่กำจัดเชื้อในปอดจะลดลง ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ง่ายและก่อให้เกิดปอดอักเสบ หากร่างกายควบคุมการติดเชื้อร่วมไม่ได้ อาจทำให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนต่อเนื่องและนำไปสู่อาการรุนแรงหรือเสียชีวิต Ref (2,3)

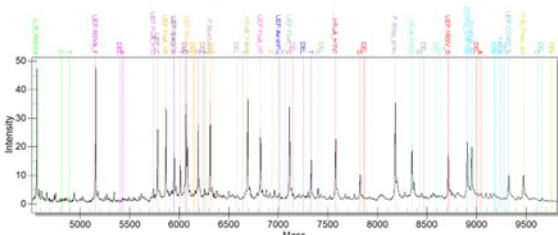
หลักการการทำงานของ MassARRAY

MassARRAY เป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมทั้งดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยอาศัยหลักการของ Multiplex PCR ร่วมกับ MALDI-TOF Mass Spectrometry เพื่อระบุการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมได้อย่างแม่นยำ หลักการทำงานของเทคโนโลยีนี้ คือ การวัด “น้ำหนักมวลโมเลกุล” ของชิ้นส่วนสารพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วยเบสพื้นฐาน 4 ชนิด ได้แก่ Adenine (A), Cytosine (C), Guanine (G) และ Thymine (T) แต่ละเบสจะมีน้ำหนักเฉพาะตัวแตกต่างกัน ดังนั้น เมื่อตำแหน่งของเบสเปลี่ยนไป เช่น การกลายพันธุ์ (SNP หรือ Variant site) น้ำหนักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอก็จะเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยเครื่อง MassARRAY



ภาพ 4 ความแตกต่างของมวลของสารพันธุกรรมสามารถตรวจจับได้โดยเทคโนโลยี MassARRAY

เทคโนโลยี MassARRAY มาพร้อมซอฟต์แวร์ที่ใช้งานง่าย แสดงผลในรูปแบบกราฟและ Spectrum Plot โดยระบบจะแปลงข้อมูลจาก Mass Spectrometry Spectra ของผลิตภัณฑ์ PCR เป็นค่ามวลโมเลกุล เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุ การกลายพันธุ์หรือ SNP ผลลัพธ์จะแสดงเป็น กราฟพีค (Peak Spectrum) ช่วยให้การวิเคราะห์และแปลผลทำได้ง่ายและเข้าใจง่าย



ภาพ 5 สเปกตรัมพีค แสดงให้เห็นถึงการจับตำแหน่งพีคของแต่ละ Mass ทั้งหมดในการวิเคราะห์ โดยผ่านการทำ Multiplex PCR

ตำแหน่งเป้าหมายทั้งหมดในชุดตรวจเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจด้วยเทคนิค MassARRAY

Respiratory Viruses: 16 Types

Influenza A virus
Influenza A virus subtype H1N1
Influenza A virus subtype H3N2
Influenza A virus subtype H5
Influenza A virus subtype H7
Influenza A virus subtype H9
Influenza A virus subtype H10
Influenza B virus
Influenza B virus subtype Victoria
Influenza B virus subtype Yamagata
SAR-CoV-2 (N gene)
SAR-CoV-2 (ORF1ab)
Respiratory Syncytial Virus (RSV) subtype A
Respiratory Syncytial Virus (RSV) subtype B
Rhinovirus A
Rhinovirus B

Bacterial Pathogens: 3 Types

<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Mycoplasma pneumonia</i>

Human Control gene

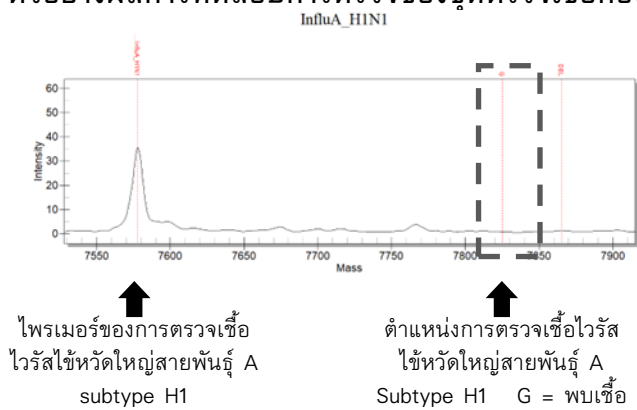
RNaseP

จุดเด่นของชุดตรวจเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจด้วยเทคนิค MassARRAY

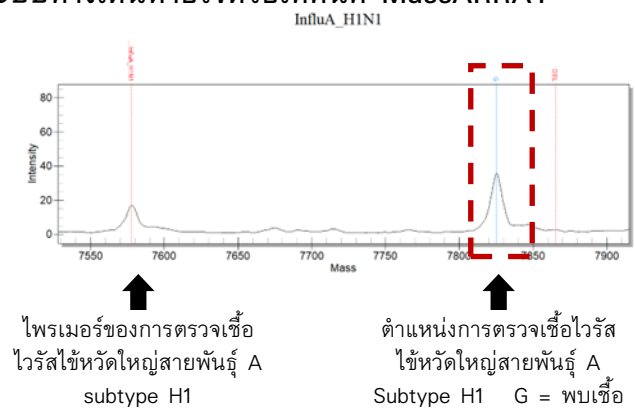
- **ความน่าเชื่อถือสูง:** สามารถตรวจจับกรดนิวคลีอิกของเชื้อก่อโรคได้โดยตรง มีความจำเพาะและความแม่นยำสูง
- **ต้นทุนต่ำ:** ตรวจหาเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจได้ในปฏิกิริยาเดียว ครอบคลุมเชื้อไวรัส 16 ชนิด และเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด (ค่าตรวจประมาณ 700 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง)
- **ระยะเวลาในการออกผลรวดเร็วและรองรับปริมาณงานสูง:** สามารถออกรายงานผลการตรวจได้ภายใน 24 ชั่วโมง
- **มีความยืดหยุ่น ใช้งานง่าย และเป็นระบบอัตโนมัติ:** ขั้นตอนการทำงานสะดวก ลดความซับซ้อน และรายงานผลการตรวจแบบอัตโนมัติ
- **รองรับการออกแบบรายงานผลอัตโนมัติ:** สามารถสร้างรายงานผลการตรวจได้โดยตรงจากไฟล์ MassARRAY และปรับแต่งรายละเอียดของรายงานตามความต้องการ ช่วยเพิ่มความรวดเร็วและประสิทธิภาพในการปฏิบัติงาน

ภาพ 6 Genotype Report สามารถส่งออกได้ในรูปแบบไฟล์ Excel สามารถอ่านและแปลผลได้อย่างสะดวก

ตัวอย่างผลการทดสอบการตรวจของชุดตรวจเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจด้วยเทคนิค MassARRAY



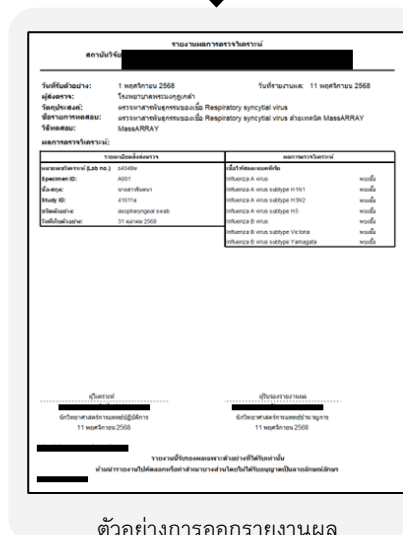
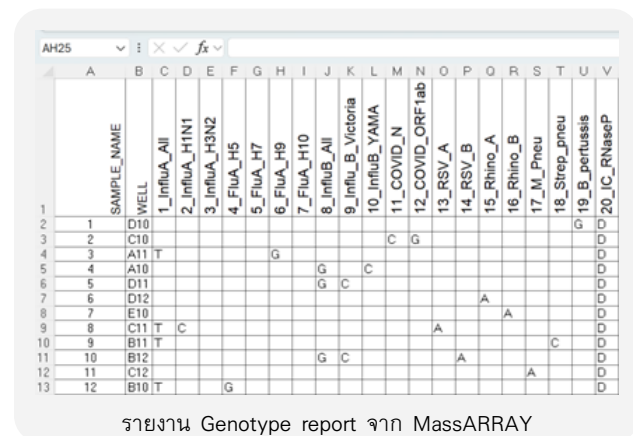
ภาพ 7 แสดงการอ่านผลแมสสเปคตรัมสำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A subtype H1 ในกรณีที่ไม่มีการตรวจพบเชื้อออกแบบให้ไม่อ่านผล



ภาพ 8 แสดงการอ่านผลแมสสเปคตรัมสำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A subtype H1 ตรวจพบจีโนไทป์ G (เส้นสีฟ้า)

ตัวอย่างการออกรายงานผลโดยใช้การรัน Macro จากไฟล์ Excel

ระบบสามารถจัดทำรายงานผลแบบอัตโนมัติ โดยดึงข้อมูลผลการตรวจจากไฟล์ MassARRAY มาใช้ในการสร้างรายงานได้โดยตรง อีกทั้งยังสามารถปรับแก้รูปแบบและรายละเอียดของรายงานให้สอดคล้องกับความต้องการ ช่วยเพิ่มความรวดเร็ว ลดความผิดพลาด และยกระดับประสิทธิภาพการดำเนินงานโดยรวม



ตัวอย่างการออกรายงานผล

ประสิทธิภาพการตรวจของชุดตรวจเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจด้วยเทคนิค MassARRAY เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน RT-PCR (gold standard)

การประเมิน	ตัวชี้วัด	ผลการประเมิน
Specificity	Overall Call Rate	96.43%
	ช่วงความ สม่ำเสมอของการ ตรวจ	83.33–100%
Sensitivity	Average Limit of Detection (LoD)	20 copies/mL
	RT-PCR Ct val- ues	Ct 33.38–41.51
ประสิทธิภาพ เชิงวิเคราะห์	ความไวเชิง วิเคราะห์โดยรวม	สูง (เหมาะสำหรับการตรวจ คัดกรอง)
ต้นทุน	การลดต้นทุนการ ตรวจ	ต้นทุนลดลงประมาณ 30%
ระยะเวลาออก ผล	Turnaround time	ภายใน 24 ชั่วโมง
ความสามารถ รองรับงาน	Throughput	รองรับการตรวจหลายตัวอย่าง และหลายเป้าหมายพร้อมกัน
ความ เหมาะสมเชิง คลินิก	การใช้งาน	เหมาะสำหรับการตรวจคัด กรองและการเฝ้าระวังโรคติด เชื้อทางเดินหายใจ

ชุดตรวจนี้มีความจำเพาะ และความไวสูง สามารถตรวจพบเชื้อในระดับความเข้มข้นต่ำ ลดต้นทุนการตรวจได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม รองรับการตรวจหลายเชื้อพร้อมกันและออกรายงานผลได้ภายในระยะเวลาที่เหมาะสม จึงมีศักยภาพสูงสำหรับการใช้งานทั้งในการตรวจคัดกรอง งานวินิจฉัย และการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ

ตารางเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐาน RT-PCR, NGS และ เทคนิค MassARRAY ชุดตรวจเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ

	Real-time PCR	NGS (Next-Generation Sequencing)	MassARRAY (MALDI-TOF + PCR)
หลักการ	การขยายดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอและวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบเรียลไทม์	การลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมดในตัวอย่าง	การขยายดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอและต่อด้วย single-base extension อ่านผลด้วย MALDI-TOF
จำนวนเชื้อพร้อมกัน	ปานกลาง จำกัดโดยจำนวนสี/โพรบและช่องสัญญาณ	สูงมาก ตรวจได้หลายร้อยถึงพัน ๆ เชื้อพร้อมกัน	สูง ตรวจหลายสิบเป้าหมายในคราวเดียวได้ง่าย
ความไว (Sensitivity)	สูงสำหรับเป้าหมายที่รู้จักและออกแบบ primer/probe ได้ดี	สูง แต่ขึ้นกับความครอบคลุมและความลึกของ sequencing	สูงเทียบเท่า RT-PCR
ความจำเพาะ (Specificity)	สูงเมื่อใช้ probe เฉพาะเจาะจง	สูง สามารถจำแนกสายพันธุ์/ยีนแตกต่างได้	สูง การเลือก target ชัดเจนและไม่มีสัญญาณทับซ้อน
ข้อมูลรายละเอียดเชื้อ	จำกัดเพียงชนิดที่ออกแบบไว้เท่านั้น	ครอบคลุมทั้งชนิดและสายพันธุ์ รวม novel/ไม่ทราบชนิด	จำกัด target ที่ออกแบบไว้ แต่มีความแม่นยำ
ระยะเวลาออกผล	เร็ว ภายในไม่กี่ชั่วโมง	ช้า หลายวันถึงสัปดาห์	ปานกลาง ภายในวันเดียว
ต้นทุนหลักการตรวจ	ต่ำถึงปานกลาง	สูงที่สุด (sequencer + bioinformatics)	ปานกลาง เหมาะกับงาน throughput สูง
การวิเคราะห์ข้อมูล	ไม่ซับซ้อน	ซับซ้อน ต้องใช้ bioinformatics pipeline	ไม่ซับซ้อน software จัดการรายงานผลได้ง่าย
ข้อดีเด่น	- เหมาะสำหรับการวินิจฉัยทางคลินิกของเชื้อเป้าหมายที่ทราบแน่ชัด - ให้ผลเชิงปริมาณ เช่น ค่า Ct - ขั้นตอนและการแปลผลง่าย	- ครอบคลุมเชื้อทั้งหมดในตัวอย่างเดียว - เหมาะสำหรับการค้นพบเชื้อใหม่หรือเชื้อที่ไม่คาดคิด - ให้ข้อมูลเชิงลึกระดับสายพันธุ์และจีโนม	- รองรับการตรวจแบบ multiplex จำนวนมากในปฏิกิริยาเดียว - ลดต้นทุนต่อ target เมื่อเทียบกับการทำหลาย PCR - รองรับงานปริมาณตัวอย่างสูง (high throughput) และออกรายงานผลได้รวดเร็ว
ข้อจำกัด	- ตรวจได้เฉพาะเชื้อที่ออกแบบ primer/probe ไว้ - จำนวนเป้าหมายที่ตรวจพร้อมกันจำกัด	- ค่าใช้จ่ายสูง - ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน - ต้องใช้ความเชี่ยวชาญด้าน bioinformatics	- ต้องออกแบบ panel ล่วงหน้า - ไม่เหมาะสำหรับการค้นหาเชื้อที่ไม่ทราบชนิดมาก่อน

MassARRAY เป็นเทคนิคทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการตรวจเชื้อระบบทางเดินหายใจหลายชนิดพร้อมกันในต้นทุนที่คุ้มค่า ให้ผลรวดเร็ว และรองรับปริมาณงานสูง ขณะที่ยังคงความแม่นยำใกล้เคียงกับ Real-time PCR และไม่ซับซ้อนด้านการวิเคราะห์ข้อมูลเหมือน NGS

อ้างอิง

- Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D (2013) Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. PLOS Pathogens 9(1): e1003057.
- Community-acquired bacterial coinfections and COVID-19. Michael John Patton, Amit Gaggar, Matthew Might, Nathaniel Erdmann, Carlos J. Orihuela, and Kevin S. Harrod. Physiological Reviews 2024 104:1, 1-21
- Ghoneim, H. E., Thomas, P. G. & McCullers, J. A. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. J. Immunol. 191, 1250–1259 (2013).
- Kim, JA., Kim, JM., Lee, C. et al. Development and evaluation of a hybrid capture-based NGS panel for comprehensive detection of respiratory pathogens. Sci Rep 15, 42238 (2025).
- McCullers, J. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. Nat Rev Microbiol 12, 252–262(2014).
- Smith, A. M. et al. Kinetics of coinfection with influenza A virus and Streptococcus pneumoniae. PLoS Pathog. 9, e1003238 (2013).
- Wacharapluesadee, S., Hirunpatrawong, P., Petcharat, S. et al. Simultaneous detection of omicron and other SARS-CoV-2 variants by multiplex PCR MassARRAY technology. Sci Rep 13, 2089 (2023).
- Zhao H, Yang Y, Lyu J, Ren X, Cheng W. Development and application of a method to detect 27 respiratory pathogens using multiplex RT-PCR combined with MassARRAY technology. BMC Infect Dis. 2021 Aug 25;21(1):870.



บริษัท ไลฟอมิกส์ จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533



 lifomicsth
  @lifomics
  www.lifomics.com