

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การพัฒนาระบบประเมินคุณภาพภายนอกโดยใช้การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ
สำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วย Real-time PCR ของห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต
สังกัดกรมควบคุมโรค ในประเทศไทย

The Development of an External Quality Assessment System Using Inter-
Laboratory Comparison for Real-Time PCR-Based Malaria Diagnosis in Regional
Reference Laboratories under the Department of Disease Control, Thailand

จันทพร จินา¹

Junporn Jina¹

ธวาท สุวรรณลา¹

Tuvaporn Suwanla¹

เพลินพิศ พันพราน²

Plernpit Punpran²

¹กองโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค

¹Division of Vector Borne Diseases,
Department of Disease Control

²สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี
กรมควบคุมโรค

²The Office of Disease Prevention and
Control 6 Chonburi, Department of Disease
Control

DOI : <https://doi.org/10.14456/vbdj.2026.3>

Received : April 22, 2026

Revised : June 24, 2026

Accepted : June 24, 2026

บทคัดย่อ

โรคไข้มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ โดยเฉพาะในประเทศที่มุ่งสู่การกำจัดโรค การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) เป็นเครื่องมือที่สำคัญ ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจพบการติดเชื้อระดับต่ำและจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียได้อย่างแม่นยำ อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยยังไม่มีระบบประเมินคุณภาพภายนอก (External Quality Assessment; EQA) สำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธีดังกล่าวในเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบประเมินคุณภาพภายนอกสำหรับการใช้ในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory Comparison; ILC) และประเมินสมรรถนะของห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต สังกัดกรมควบคุมโรค

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา ดำเนินการระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2565 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2568 ในห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตจำนวน 10 แห่ง สังกัดกรมควบคุมโรค ตัวอย่างทดสอบพัฒนาจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัยในรูปแบบ dried blood spot (DBS) ครอบคลุมเชื้อ *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* และตัวอย่างลบ โดยผ่านการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และความคงตัว (stability) ก่อนนำไปใช้ในการประเมินสมรรถนะห้องปฏิบัติการ ซึ่งผู้เข้ารับการประเมินดำเนินการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ตามวิธีมาตรฐานของแต่ละแห่ง และรายงานผลการตรวจเป็นชนิดเชื้อ และค่า cycle threshold (Ct)

ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่าง DBS ที่พัฒนาขึ้นมีคุณภาพเหมาะสมสำหรับใช้ในระบบ ILC โดยมีความสัมพันธ์ความแปรปรวนของค่า Ct ไม่เกินร้อยละ 5 และมีความแตกต่างของค่า Ct ระหว่างการทดสอบความคงตัวไม่เกิน ± 1.0 เมื่อนำไปใช้ในการประเมินสมรรถนะจำนวน 2 รอบ พบว่ารอบที่ 1 ห้องปฏิบัติการทั้ง 10 แห่งได้รับคะแนนร้อยละ 100 ขณะที่รอบที่ 2 ห้องปฏิบัติการ 9 แห่งได้รับคะแนนร้อยละ 100 และ 1 แห่งได้รับคะแนนร้อยละ 80 จากการรายงานผลคลาดเคลื่อน 1 ตัวอย่าง ส่งผลให้คะแนนเฉลี่ยของเครือข่ายเท่ากับร้อยละ 99 ($SD = 3.16$) การประเมินค่าความสอดคล้องด้วยสถิติ Fleiss' Kappa ของผลตรวจเท่ากับ 0.976 ($p < 0.001$) จัดอยู่ในระดับ Almost Perfect Agreement และค่า ΔCt อยู่ในช่วง -0.91 ถึง 0.98 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งหมด การวิเคราะห์ Z-score พบว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($|Z| \leq 2$) จากผลการตรวจทั้งหมด 99 ตัวอย่าง พบค่าความไวร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะร้อยละ 95.24 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 98.75 และค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 100

สรุปได้ว่าระบบ ILC ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นเครื่องมือประเมินคุณภาพภายนอกสำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยประเมินความถูกต้อง ความสอดคล้อง และความสามารถของห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์ภายใต้สภาวะการปฏิบัติงานจริง อีกทั้งยังสามารถระบุความคลาดเคลื่อนและสนับสนุนการปรับปรุงคุณภาพอย่างต่อเนื่อง อันจะช่วยเสริมสร้างความเชื่อมั่นของข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ สนับสนุนการดำเนินงานตามมาตรฐาน ISO 15189 และการเฝ้าระวังเพื่อการกำจัดโรคไข้มาลาเรียของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

ติดต่อผู้พิมพ์ : จันทรพร จินา

อีเมล : junporn.jina.plasingha@gmail.com

Abstract

Malaria remains a major global public health challenge, particularly in countries pursuing malaria elimination. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) is a highly sensitive and specific diagnostic method capable of detecting low-density and asymptomatic infections. However, a standardized External Quality Assessment (EQA) system for malaria diagnosis using Real-time PCR has not previously been established for the network of regional reference laboratories under Thailand's Department of Disease Control (DDC). This study aimed to develop an External Quality Assessment system using an Inter-laboratory Comparison (ILC) approach and to evaluate the performance of regional reference laboratories for malaria diagnosis by Real-time PCR.

A descriptive study was conducted between September 2022 and October 2025 involving 10 regional reference laboratories under the DDC. Dried blood spot (DBS) panels were developed from residual malaria-positive blood specimens representing five human malaria species (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi*) and negative controls. The DBS panels were evaluated for homogeneity and stability before being distributed for two rounds of ILC assessment. Participating laboratories performed malaria detection using their routine Real-time PCR protocols and reported species identification and cycle threshold (Ct) values. Laboratory performance was assessed using concordance rates, Z-scores, and diagnostic performance indicators.

The developed DBS panels demonstrated acceptable homogeneity and stability, with Ct coefficient of variation values below 5% and Ct variation within ± 1.0 cycle. Across two ILC rounds, the participating laboratories achieved a mean performance score of 99% (SD = 3.16). All laboratories obtained 100% accuracy in the first round, while nine laboratories achieved 100% accuracy in the second round and one laboratory obtained 80% due to a single discrepant result involving a low-concentration *P. knowlesi* specimen. Overall agreement among laboratories was excellent, with a concordance coefficient (Fleiss' Kappa) of 0.976 ($p < 0.001$), indicating almost perfect agreement. Most laboratories showed acceptable Z-scores ($|Z| \leq 2$), and Ct deviations remained within the predefined acceptance limits. Diagnostic performance analysis demonstrated 100% sensitivity, 95.24% specificity, 98.75% positive predictive value, and 100% negative predictive value.

The ILC-based EQA system developed in this study is suitable for evaluating the performance of malaria Real-time PCR laboratories. The findings demonstrate a high level of inter-laboratory agreement and confirm the capability of Thailand's regional reference laboratory network to provide reliable molecular diagnosis for malaria surveillance and elimination activities. This system also supports compliance with ISO 15189 requirements and strengthens confidence in laboratory data used for malaria control and elimination programs in Thailand.

Corresponding Author : Junporn Jina

E-mail : junporn.jina.plasingha@gmail.com

คำสำคัญ

Real-time PCR, มาลาเรีย, ระบบประเมินคุณภาพภายนอก, การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ

Keywords

Real-time PCR, Malaria, External Quality Assessment, Inter-laboratory Comparison

บทนำ

โรคไข้มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของโลก โดยองค์การอนามัยโลกรายงานว่าในปี พ.ศ. 2566 มีผู้ป่วยประมาณ 263 ล้านรายและมีผู้เสียชีวิตประมาณ 597,000 รายทั่วโลก โรคนี้เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในสกุล *Plasmodium* ซึ่งติดต่อผ่านยุงก้นปล่องเพศเมีย โดยเชื้อที่ก่อโรคในมนุษย์ประกอบด้วย *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* ประเทศไทยได้กำหนดยุทธศาสตร์การกำจัดโรคไข้มาลาเรีย พ.ศ. 2560 – 2569 โดยมุ่งเน้นการลดการแพร่เชื้อในพื้นที่ชายแดนและการเฝ้าระวังการติดเชื้อในระยะกำจัดโรค⁽¹⁻²⁾ การตรวจวินิจฉัยที่มีความถูกต้องและรวดเร็วเป็นองค์ประกอบสำคัญของการควบคุมและกำจัดโรคไข้มาลาเรีย ปัจจุบันการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถระบุชนิดเชื้อและประเมินความหนาแน่นของเชื้อได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัด

ในการตรวจพบเชื้อที่มีปริมาณต่ำและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญสูง ขณะที่ชุดตรวจวินิจฉัยแบบรวดเร็ว (Rapid Diagnostic Test; RDT) แม้จะสะดวกและเหมาะสำหรับการใช้งานภาคสนาม แต่ยังมีข้อจำกัดในการตรวจพบการติดเชื้อที่มีปริมาณเชื้อต่ำหรือการติดเชื้อแบบผสม⁽³⁻⁴⁾ เทคนิคอณูชีววิทยา เช่น Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) ได้รับการยอมรับว่ามีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจพบการติดเชื้อระดับต่ำ (submicroscopic infection) และจำแนกชนิดเชื้อได้อย่างแม่นยำ จึงมีบทบาทสำคัญในการเฝ้าระวังโรคในระยะกำจัด โดยเฉพาะการตรวจยืนยันผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการและการติดเชื้อแบบผสมโดยวิธี Real-time PCR จะมีการรายงานผลได้ทั้งเชิงคุณภาพว่าพบสารพันธุกรรมของเชื้อหรือไม่ และเชิงปริมาณที่มีการรายงานเป็นค่า cycle threshold (Ct) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเชื้อใน

กระแสเลือด นอกจากนี้ ค่า cycle threshold (Ct) ที่ได้จากการตรวจ Real-time PCR ยังสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความสอดคล้องของผลการตรวจระหว่างห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย⁽⁵⁻⁶⁾ ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับห้องปฏิบัติการที่จะพัฒนาระบบมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เช่น มาตรฐานเทคนิคการแพทย์ และมาตรฐานสากล ISO 15189 โดยตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO 15189:2022 ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จำเป็นต้องมีระบบประกันคุณภาพที่ครอบคลุมทั้งการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control; IQC) และการประเมินคุณภาพภายนอก (External Quality Assessment; EQA) เพื่อให้มั่นใจว่าผลการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้อง เชื่อถือได้ และสามารถเปรียบเทียบกันได้ระหว่างห้องปฏิบัติการ⁽⁷⁾ ระบบ EQA เป็นกระบวนการประเมินสมรรถนะของห้องปฏิบัติการโดยใช้ตัวอย่างทดสอบที่มีค่าอ้างอิงเดียวกันส่งให้ผู้เข้าร่วมดำเนินการตรวจวิเคราะห์ภายใต้สภาวะการทำงานจริง ก่อนนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบและประเมินความถูกต้องของผลตรวจ⁽⁸⁾ รูปแบบหนึ่งของ EQA ที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง คือ การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory Comparison; ILC) ซึ่งเป็นกิจกรรมที่ใช้ตัวอย่างทดสอบเดียวกันส่งให้ห้องปฏิบัติการหลายแห่งดำเนินการตรวจวิเคราะห์ และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อประเมินความสอดคล้องของผลตรวจ ค้นหาความแปรปรวนระหว่างห้องปฏิบัติการ รวมถึงระบุสาเหตุของความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นจากบุคลากร เครื่องมือ น้ำยา หรือขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์⁽⁹⁻¹⁰⁾ สำหรับการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR ซึ่งประกอบด้วยหลายขั้นตอนตั้งแต่การสกัดสารพันธุกรรม การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการแปลผล การดำเนินการกิจกรรม EQA และ ILC จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการประเมินคุณภาพของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทั้งระบบ⁽¹¹⁾ ปัจจุบันประเทศไทยมีห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่สามารถตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ทั้งในสถาบันการศึกษา ภาคเอกชน และหน่วยงานภาครัฐ โดยห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตด้านโรคติดต่อ-นำโดยแมลง สังกัดกรมควบคุมโรค เป็นกลไกสำคัญในการสนับสนุนการเฝ้าระวัง การยืนยันผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และการตอบโต้

ภาวะฉุกเฉินด้านโรคติดต่อนำโดยแมลงของประเทศ ปัจจุบันมีห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตด้านโรคติดต่อนำโดยแมลงจำนวนทั้งสิ้น 12 แห่ง ตั้งอยู่ในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคทั่วประเทศ ครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศไทย ซึ่งทำหน้าที่เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคไข้มาลาเรีย รวมทั้งสนับสนุนการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา และการพัฒนาศักยภาพเครือข่ายห้องปฏิบัติการในพื้นที่รับผิดชอบ แม้ว่าห้องปฏิบัติการเหล่านี้จะดำเนินการกิจกรรมควบคุมคุณภาพตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO 15189 แต่ในช่วงเริ่มต้นของการศึกษา ยังไม่มีระบบประเมินคุณภาพภายนอก (External Quality Assessment; EQA) หรือการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory Comparison; ILC) ที่พัฒนาขึ้น เฉพาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ในเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตดังกล่าว ส่งผลให้ยังไม่มีระบบที่สามารถใช้ประเมินและเปรียบเทียบสมรรถนะของห้องปฏิบัติการในระดับประเทศ ทั้งในด้านความถูกต้องของการตรวจพบเชื้อ ความสามารถในการจำแนกชนิดเชื้อ ซึ่งการขาดระบบ EQA หรือ ILC อาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแปรปรวนหรือความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความแตกต่างของบุคลากร เครื่องมือ ชุดน้ำยา หรือขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างทันทั่วทั้งที่อาจนำไปสู่ความแตกต่างของผลตรวจระหว่างห้องปฏิบัติการ รวมถึงการเกิดผลบวกปลอมหรือผลลบปลอม ส่งผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของข้อมูลทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการเฝ้าระวังโรค การยืนยันผู้ป่วย และการติดตามสถานการณ์การแพร่เชื้อ โดยเฉพาะในระยะกำจัดโรคที่มุ่งค้นหาผู้ติดเชื้อที่มีปริมาณเชื้อต่ำหรือไม่แสดงอาการ หากผลตรวจขาดความถูกต้องหรือความสอดคล้อง อาจทำให้เกิดการประเมินสถานการณ์โรคต่ำกว่าความเป็นจริง ส่งผลต่อการวางแผนมาตรการควบคุมโรค การจัดสรรทรัพยากร และความก้าวหน้าตามเป้าหมายการกำจัดโรคไข้มาลาเรียของประเทศ นอกจากนี้ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า มีรายงานการดำเนินการกิจกรรม EQA และ ILC สำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในหลายสาขา รวมถึงการตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR ในต่างประเทศ⁽¹¹⁻¹²⁾ แต่ยังมีข้อมูลจำกัดเกี่ยวกับ

การพัฒนาระบบ EQA หรือ ILC สำหรับการตรวจวินิจฉัย มาลาเรียด้วย Real-time PCR ในบริบทของประเทศไทย โดยเฉพาะการใช้ตัวอย่าง dried blood spot (DBS) ที่พัฒนาจากตัวอย่างผู้ป่วยจริงเพื่อประเมินสมรรถนะของเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้ตัวอย่างทดสอบในรูปแบบ dried blood spot (DBS) สำหรับกิจกรรม ILC จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่ตรวจพบภายในประเทศ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการจัดหาวัสดุควบคุมคุณภาพจากต่างประเทศ และเพิ่มความยั่งยืนของระบบประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการในระยะยาว สำหรับสนับสนุนการเฝ้าระวัง ควบคุม และกำจัดโรคไข้มาลาเรียของประเทศไทยอย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาระบบประเมินคุณภาพภายนอก สำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วย Real-time PCR ในเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต สังกัดกรมควบคุมโรค
2. เพื่อประเมินสมรรถนะของห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตโดยใช้ระบบประเมินคุณภาพที่พัฒนาขึ้น ในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study) ดำเนินการระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2565 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2568 โดยการพัฒนาตัวอย่างเชื้อมาลาเรียมาตรฐานจากตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัย และนำไปทดสอบกับห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต สังกัดกรมควบคุมโรค จำนวน 10 แห่ง ได้จากการเลือกตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive sampling) ซึ่งแต่ละห้องปฏิบัติการมีความพร้อมในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ที่ได้สมัครใจเข้าร่วมโครงการโดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

1. การพัฒนาตัวอย่างทดสอบสำหรับระบบ ILC ดำเนินการจัดเก็บและรวบรวมตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัยจากห้องปฏิบัติการเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต สังกัดกรมควบคุมโรค ระหว่างปี พ.ศ. 2565 – 2568 ที่จัดเตรียมในรูปแบบ dried blood spot (DBS) ซึ่งไม่

สามารถระบุค่าปริมาณเชื้อมาลาเรียได้ จะประกอบด้วยตัวอย่างบวกครอบคลุมเชื้อ *Plasmodium* spp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* รวมทั้งตัวอย่างลบ โดยตัวอย่างทดสอบแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อตรวจสอบคุณภาพความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และความคงตัว (stability) โดยการสกัดตัวอย่างด้วยน้ำยา QIAamp DNA Mini Kit แล้วนำ DNA template ของแต่ละตัวอย่างมาทำ Real-time PCR ด้วยน้ำยา TaqMan™ Fast Advanced Master Mix ซึ่งเป็นน้ำยาที่มีการเตรียมเอง (in-house reagent) และจะใช้ Hum_GAPDH เป็น Internal Control หรือ housekeeping gene ของมนุษย์ (human control) ตรวจสอบว่าตัวอย่างเลือดมี DNA ของมนุษย์จริง และการสกัด DNA สำเร็จ ไม่ใช่หลุดเปล่าหรือสกัดล้มเหลว และใช้ Primer และ Probe อ้างอิงจากงานวิจัยของ Rougemont และคณะ⁽¹³⁾ และ Lee และคณะ⁽¹⁴⁾ มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 และใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิเครื่อง Real-time PCR ประกอบด้วยขั้นตอน Initial Denaturation ที่ 95 °C นาน 15 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Denaturation ที่ 95 °C นาน 10 วินาที และ Annealing ที่ 60 °C นาน 50 วินาที จำนวน 40 รอบก่อนนำไปใช้ในระบบ ILC ดำเนินการทดสอบ ดังนี้

- 1.1 ความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ก่อนนำตัวอย่างทดสอบเข้าสู่ระบบ ILC ได้ทำการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง DBS โดยการสุ่มตัวอย่างจากแต่ละชุดทดสอบจำนวน 10 ตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ภายใต้สภาวะเดียวกัน จำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้น้ำยาจากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation; CV) ของค่า cycle threshold (Ct) ตามสมการดังแสดง โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับที่ค่า CV ไม่เกินร้อยละ 5
- สูตรคำนวณ

$$CV(\%) = \frac{SD}{Mean} \times 100$$

1.2 การประเมินค่าความคงตัว (stability) ตัวอย่าง DBS แต่ละตัวอย่างที่จะใช้ในระบบ ILC จะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 – 8 °C และตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ซ้ำในช่วงเวลาที่กำหนด ได้แก่ วันเริ่มต้นที่รับตัวอย่าง (Day 0) และหลังการเก็บรักษา ในช่วงเวลาที่กำหนด ได้แก่ Day 7 จากนั้นนำผลมา เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า Ct ระหว่าง ช่วงเวลาโดยคำนวณค่า ΔCt ดังสมการดังแสดง โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับให้ค่าความแตกต่างของ ค่า Ct ไม่เกิน ± 1.0 จึงถือว่าตัวอย่างมีความคงตัว เพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการเปรียบเทียบผลระหว่าง ห้องปฏิบัติการ

สูตรคำนวณ

$$\Delta Ct = Ct_t - Ct_0$$

ตารางที่ 1 ลำดับ nucleotide ของ Primer 5 ชนิด และ Internal Control⁽¹³⁻¹⁴⁾

Primer	Nucleotides
PF forward primer	5'-ATTGCTTTTGAGAGGTTTGTACTTT-3'
PF reverse primer	5'-GCTGTAGTATTCAACACATTGAACTCAA-3'
PV forward primer	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTG-3'
PV reverse primer	5'-AATTTACTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAG-3'
PM forward primer	5'-AGTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA-3'
PM reverse primer	5'-CAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3'
PO forward primer	5'-CCGACTAGGTTTTGGATGAAAGATTTTT-3'
PO reverse primer	5'-CAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3'
Pk forward primer	5'-AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3'
Pk reverse primer	5'-GTTAAGGGAGTGAAGATCAGA-3'
Hum_GAPDH_F	5'-CCT CCC GCT TCG CTC TCT-3'
Hum_GAPDH_R	5'-GCT GGC GAC GCA AAA GA-3'

ตารางที่ 2 ลำดับ nucleotide ของ Probe 5 ชนิด และ Internal Control⁽¹³⁻¹⁴⁾

Probe	Nucleotides
PF18sP	5'-6FAM-CAT AAC AGA CGG GTA GTC AT-MGBNFQ-3'
PV18sP	5'-VIC-CGC ATT TTG CTA TTA TGT-MGBNFQ-3'
PM18sP	5'-6FAM-ATG AGT GTT TCT TTT AGA TAG C-MGBNFQ-3'
PO18sP	5'-VIC-CGA AAG GAA TTT TCT TAT T-MGBNFQ-3'
PK18sP	5'-FAM-CTCTCCGAGATTAGAACTCTTAGATTGCT-TAMRA-3'
Hum_GAPDH_P	5'-VIC-CCT CCT GTT CGA CAG TCA GCC GC- MGBNFQ-3'

2. การตรวจวิเคราะห์ และเก็บข้อมูล

ในปี พ.ศ. 2568 ตัวอย่างถูกส่งให้ห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตจำนวน 10 แห่ง แห่งละ 2 รอบ รอบละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ตามวิธีมาตรฐานของแต่ละห้องปฏิบัติการ แล้วรายงานผลการตรวจในรูปแบบฟอร์ม F-P-19-06 รายงานการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการ การตรวจมาลาเรียด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา (Inter-lab comparison) ได้แก่ รหัสห้องปฏิบัติการ (LAB No.) วันที่รับตัวอย่างทดสอบ คุณภาพและความสมบูรณ์ของตัวอย่าง วันที่ทำการตรวจ ข้อมูลเครื่องมือ น้ำยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ผลการตรวจ ชนิดเชื้อ ค่า Ct แล้วให้รายงานผลกลับมายังอีเมลของศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ โรคติดต่อ นำโดยแมลง

3. การประเมินผล

รวบรวมค่าคะแนนที่ได้ของแต่ละห้องปฏิบัติการ บันทึกในตารางเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ผลการตรวจของแต่ละห้องปฏิบัติการถูกนำมาเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิง เพื่อประเมินสมรรถนะด้านความถูกต้อง (accuracy) ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ

ตารางที่ 3 เกณฑ์พิจารณาการยอมรับตัวอย่าง

ΔCt	การแปลผล
$\leq 1 Ct$	Excellent
$>1-2 Ct$	Acceptable
$>2-3 Ct$	Warning
$>3 Ct$	Investigate

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การเปรียบเทียบผลการตรวจระหว่างรอบการประเมินใช้สถิติ two-proportion z-test เพื่อบอกค่าการยอมรับได้และทำการตรวจสอบลักษณะข้อมูลว่าเป็น Nominal Data หรือไม่ เปรียบเทียบข้อมูล

(specificity) ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value; PPV) ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value; NPV) และความสอดคล้องของผลตรวจ (concordance) การประเมินผลเชิงคุณภาพ ได้แก่ ผลบวกหรือลบ และสายพันธุ์ของเชื้อที่ตรวจพบ สอดคล้องตรงกับค่าอ้างอิง โดยกำหนดผ่านเกณฑ์ที่ความสอดคล้องมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 80 สำหรับเชิงปริมาณ ค่าอ้างอิงของ Ct สำหรับแต่ละตัวอย่างกำหนดจากค่าเฉลี่ย (mean Ct) ของศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการอ้างอิงที่ดำเนินการตรวจซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ก่อนการแจกจ่ายตัวอย่างเข้าสู่ระบบ ILC และกำหนดเกณฑ์การยอมรับเป็นค่าเฉลี่ย ± 2 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm 2SD$) ตามแนวทางการวิเคราะห์ข้อมูลจากการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO 13528:2022 การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ โดยจะใช้ค่า Ct ที่รายงานจากแต่ละห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับค่าอ้างอิง และพิจารณาว่ายอมรับได้เมื่อมีค่าแตกต่างจากค่าอ้างอิงไม่เกิน $\pm 2 Ct$ ดังสูตร ΔCt ตามเกณฑ์ดังตารางที่ 3 สูตรคำนวณ

$$\Delta Ct = | Ct_{lab} - Ct_{reference} |$$

ระหว่างกลุ่มตัวอย่างว่ามีความเป็นอิสระหรือไม่ แล้วประเมินความสอดคล้องของผลการรายงานการตรวจ (Agreement) แต่ละแห่ง โดยสถิติ Fleiss' Kappa กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 แปลค่าความสอดคล้องตามเกณฑ์ของ Landis and Koch⁽¹⁵⁾ โดยมีการตีความค่า ICC และ Kappa ตาม Landis and Koch⁽¹⁵⁾ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เกณฑ์การตีความค่า ICC และ Kappa ของ Landis and Koch⁽¹⁵⁾

ICC/Kappa Statistic	Strength of Agreement
<0.00	Poor
0.01-0.20	Slight
0.21-0.40	Fair
0.41-0.60	Moderate
0.61-0.80	Substantial
0.81-1.00	Almost Perfect

5. การพิทักษ์ข้อมูล

ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมถูกเก็บรักษาเป็นความลับ และรายงานผลในลักษณะภาพรวมโดยไม่มีการเปิดเผยชื่อหรือข้อมูลที่สามารถระบุหน่วยงานได้ ซึ่งจะใช้ระบบ LAB No. ในการแสดงผลประเมินสมรรถนะของห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตทั้ง 10 แห่ง

ผลการศึกษา

1) ผลการพัฒนาตัวอย่างทดสอบสำหรับระบบ ILC

ผลการประเมินคุณภาพตัวอย่างทดสอบ ดังนี้ ค่าความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ภายใต้สภาวะเดียวกัน จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) ของค่า cycle threshold (Ct) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ค่า CV ไม่เกินร้อยละ 5 ดังแสดงในตารางที่ 5 และค่า Ct เฉลี่ยของเชื้อแต่ละชนิด มีความสม่ำเสมอและมีช่วง Mean $\pm$ 2SD ค่อนข้างแคบ ได้แก่ *P. falciparum* (20.79 – 22.75 และ 28.72 – 29.92), *P. vivax* (19.84 – 20.64 และ

27.12 – 28.32), *P. malariae* (22.79 – 23.59), *P. ovale* (24.61 – 25.05) และ *P. knowlesi* (24.94 – 25.34 และ 36.74 – 38.32) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันสำหรับค่าความคงตัวแต่ละตัวอย่างที่จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 – 8 °C และตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ซ้ำในช่วงเวลาที่กำหนด ได้แก่ วันเริ่มต้นที่รับตัวอย่าง (Day 0) และหลังการเก็บรักษาในช่วงเวลาที่กำหนด ได้แก่ Day 7 พบว่าให้ค่าความแตกต่างของค่า Ct ไม่เกิน ± 1.0 จึงถือว่าตัวอย่างมีความคงตัวเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อพิจารณาค่า Ct ของตัวอย่างอ้างอิงทั้งสองรอบ มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) ของค่า Ct ไม่เกินร้อยละ 5 ตามเกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 6 จึงถือว่าตัวอย่างมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวอย่างในระบบประเมินคุณภาพภายนอก และการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 5 ผลวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity)

Sample No.	สายพันธุ์	ค่า Cycle threshold (Ct)			Mean	SD	CV(%)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
No.1	<i>P. falciparum</i>	21.54	22.34	21.44	21.77	0.49	2.27
No.2	<i>P. vivax</i>	20.44	20.04	20.23	20.24	0.20	0.99
No.3	<i>P. malariae</i>	23.01	23.41	23.16	23.19	0.20	0.87
No.4	<i>P. ovale</i>	24.76	24.96	24.78	24.83	0.11	0.44
No.5	<i>P. knowlesi</i>	25.03	25.23	25.17	25.14	0.10	0.41
No.6	<i>P. falciparum</i> (2)	29.61	29.01	29.35	29.32	0.30	1.03
No.7	<i>P. vivax</i> (2)	27.88	27.38	27.91	27.72	0.30	1.07
No.8	<i>P. knowlesi</i> (2)	37.13	37.93	37.57	37.54	0.40	1.07
No.9	Negative	NA	NA	NA	NA	NA	NA
No.10	Negative	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*กำหนดเกณฑ์การยอมรับที่ค่า CV ไม่เกินร้อยละ 5

ตารางที่ 6 ผลวิเคราะห์ความคงตัว (Stability)

Sample No.	สายพันธุ์	ค่า Cycle threshold (Ct)		ΔCt
		DAY 0 (Ct ₀)	DAY 7 (Ct ₇)	
No.1	<i>P. falciparum</i>	21.54	22.44	0.9
No.2	<i>P. vivax</i>	20.44	20.84	0.4
No.3	<i>P. malariae</i>	23.01	22.51	-0.5
No.4	<i>P. ovale</i>	24.76	24.16	-0.6
No.5	<i>P. knowlesi</i>	25.03	25.33	0.3
No.6	<i>P. falciparum</i> (2)	29.61	29.21	-0.4
No.7	<i>P. vivax</i> (2)	27.88	28.38	0.5
No.8	<i>P. knowlesi</i> (2)	37.13	37.83	0.7
No.9	Negative	NA	NA	NA
No.10	Negative	NA	NA	NA

* กำหนดเกณฑ์การยอมรับให้ค่าความแตกต่างของค่า Ct ไม่เกิน ± 1.0

2) ผลการประเมินการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ILC

จากผลการดำเนินการกิจกรรมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ILC สำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ในปี พ.ศ. 2568 จำนวน 2 รอบ พบว่าห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตทั้ง 10 แห่งสามารถตรวจจำแนกชนิดเชื้อ *Plasmodium* ได้อย่างถูกต้องและสอดคล้องกับค่าอ้างอิงในระดับสูงในการประเมินรอบที่ 1 (DVBD2511 – DVBD2515) ห้องปฏิบัติการทุกแห่งรายงานผลถูกต้องร้อยละ 100

สำหรับตัวอย่าง *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi* และตัวอย่างลบ ส่งผลให้มีความสอดคล้องของผลตรวจ (concordance) ร้อยละ 100 ในทุกห้องปฏิบัติการ ขณะที่ค่า cycle threshold (Ct) ที่รายงานมีความแตกต่างจากค่าอ้างอิง (ΔCt) อยู่ในช่วง -0.91 ถึง 0.98 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งหมด และได้รับการประเมินในระดับ Excellent สำหรับการประเมินรอบที่ 2 (DVBD2521 – DVBD2525) สำหรับตัวอย่าง *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi* และตัวอย่างลบ ยังคงพบสมรรถนะการตรวจวิเคราะห์

ในระดับสูง โดยห้องปฏิบัติการ 9 จาก 10 แห่ง รายงานผลถูกต้องครบถ้วนและได้รับคะแนนร้อยละ 100 ขณะที่ห้องปฏิบัติการ 1 แห่งรายงานผลคลาดเคลื่อนในการตรวจตัวอย่าง *P. knowlesi* จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่งผลให้ได้รับคะแนนร้อยละ 80 เนื่องจากรายงานผลคลาดเคลื่อนในตัวอย่าง จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่งผลให้ภาพรวมของเครือข่ายมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 99 (SD = 3.16) สะท้อนถึงระดับความสอดคล้องของผลตรวจที่สูงมากระหว่างห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์ค่า Z-score พบว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มีค่า Z-score เท่ากับ 0.316 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($|Z| \leq 2$) แสดงให้เห็นว่า

ผลการตรวจมีความสอดคล้องกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มผู้เข้าร่วม ขณะที่ห้องปฏิบัติการที่มีผลคลาดเคลื่อน 1 ตัวอย่าง มีค่า Z-score เท่ากับ -2.846 ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งอยู่ในระดับที่ควรได้รับการทบทวนสาเหตุของความคลาดเคลื่อนและดำเนินการแก้ไขตามหลักการประเมินสมรรถนะของการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม ค่า Ct ของห้องปฏิบัติการที่รายงานผลถูกต้องยังคงมีความแตกต่างจากค่าอ้างอิงในระดับต่ำ (ΔCt) ระหว่าง -0.98 ถึง 0.93) สะท้อนถึงความสอดคล้องของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 7 ค่าคะแนน และค่าการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกลุ่มเข้าร่วมด้วย Z-score

หน่วยงาน	ค่าคะแนน ปี พ.ศ. 2568	จำนวนตัวอย่าง บวกทั้งสองรอบ ที่ตรวจถูก	จำนวนตัวอย่าง ลบทั้งสองรอบ ที่ตรวจถูก	จำนวนตัวอย่าง ทั้งหมดที่ตรวจถูก ตรงกัน	Z-score
LAB01	100	8	2	10	0.316
LAB02	100	8	2	10	0.316
LAB03	100	8	2	10	0.316
LAB04	100	8	2	10	0.316
LAB05	100	8	2	10	0.316
LAB06	100	8	2	10	0.316
LAB07	80	7	2	9	-2.846
LAB08	100	8	2	10	0.316
LAB09	100	8	2	10	0.316
LAB10	100	8	2	10	0.316
รวม		79	20	99	
Mean = 99, SD = 3.16					

3) ผลทางสถิติสำหรับการประเมินระบบ ILC

จากการวิเคราะห์ผลการตรวจทั้งหมด จำนวน 99 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างบวกจำนวน 79 ตัวอย่าง และตัวอย่างลบจำนวน 20 ตัวอย่าง ได้รับการรายงานผลถูกต้อง โดยพบผลบวกสูง (false positive) จำนวน 1 ตัวอย่าง และไม่พบผลลบสูง (false negative) เมื่อนำข้อมูลมาคำนวณค่าประสิทธิภาพของระบบ พบว่าการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ของเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 95.24

ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value; PPV) ร้อยละ 98.75 และค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value; NPV) ร้อยละ 100 ดังแสดงในตารางที่ 8 และพบว่าการประเมินความสอดคล้องของผลการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ระหว่างห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม จำนวน 10 แห่ง โดยใช้สถิติ Fleiss' Kappa พบว่า Observed Agreement ($\bar{P}$) และ Expected Agreement by Chance ($\bar{P}_e$) เมื่อคำนวณทางสถิติพบว่ามีความสอดคล้องเท่ากับ 0.976 ($p < 0.001$) จัดอยู่ในระดับ Almost Perfect Agreement สะท้อนถึง

ความสอดคล้องของผลการตรวจระหว่างห้องปฏิบัติการ คาดหมายเพียง 1 รายงานจากทั้งหมด 100 รายงาน
ในระดับสูงมาก โดยมีผลการรายงานที่ไม่ตรงกับค่า (1.0%) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ตาราง 2x2 แสดงข้อมูลการคำนวณ sensitivity specificity PPV และ NPV

		ผล Inter-Lab		
		ผลบวก	ผลลบ	
ค่าอ้างอิง	ผลบวก	79	1	PPV $(79/80) \times 100 = 98.75$
	ผลลบ	0	20	NPV $(20/20) \times 100 = 100$
		sensitivity	specificity	
		$(79/79) \times 100 = 100$	$(20/21) \times 100 = 95.24$	

ตารางที่ 9 สรุปข้อมูลรายงานผล ILC ของห้องปฏิบัติการทั้ง 10 แห่ง

ตัวอย่าง	จำนวนรายงาน	จำนวนรายงานสอดคล้อง
DVBD2511	10	10
DVBD2512	10	10
DVBD2513	10	10
DVBD2514	10	10
DVBD2515	10	10
DVBD2521	10	10
DVBD2522	10	10
DVBD2523	10	10
DVBD2524	10	9*
DVBD2525	10	10
รวม	100	99

*9 แห่ง รายงานเป็น *P. knowlesi* และ 1 แห่ง รายงานเป็น Negative

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาระบบประเมินคุณภาพภายนอกสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR และการประเมินสมรรถนะของเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขตสังกัดกรมควบคุมโรค โดยพบว่าตัวอย่างทดสอบในรูปแบบ dried blood spot (DBS) ที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีค่าความคงตัวอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ส่งผลให้ค่า Ct ของตัวอย่างอ้างอิงมีความสม่ำเสมอและเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวัสดุทดสอบในระบบ ILC ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของการประเมินสมรรถนะระหว่างห้องปฏิบัติการ ผลการประเมินห้องปฏิบัติการจำนวน 10 แห่ง พบว่ามีคะแนนเฉลี่ย ร้อยละ 99

มีค่าความสอดคล้องของผลตรวจ (Fleiss' kappa) เท่ากับ 0.976 ($p < 0.001$) จัดอยู่ในระดับ Almost Perfect Agreement และมีค่า ΔCt อยู่ในช่วง -0.91 ถึง 0.98 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งหมด สะท้อนถึงความสอดคล้องของผลตรวจวิเคราะห์ และความสามารถในการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ในระดับสูงของทุกห้องปฏิบัติการ ซึ่งกระบวนการพัฒนาระบบดังกล่าวสอดคล้องกับข้อกำหนดของ ISO 15189:2022 ที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการเข้าร่วมกิจกรรมประเมินคุณภาพภายนอกเพื่อแสดงความสามารถของกระบวนการตรวจวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง⁽⁷⁾ นอกจากนี้ ผลการศึกษาที่ยืนยันถึงประสิทธิภาพของเทคนิค Real-time PCR ซึ่งมีค่าความไว (sensitivity) และค่าพยากรณ์ผลลบ (NPV)

เท่ากับร้อยละ 100 สอดคล้องกับรายงานของ Wang และคณะ⁽³⁾ และ Mpina และคณะ⁽⁵⁾ ที่พบว่า Real-time PCR มีค่าความไวและความจำเพาะสูงสามารถตรวจพบการติดเชื้อมาลาเรียได้ดี เมื่อพิจารณาผลการประเมินรายห้องปฏิบัติการ พบว่ามีห้องปฏิบัติการเพียง 1 แห่ง ที่รายงานผลคลาดเคลื่อนในตัวอย่าง *P. knowlesi* ซึ่งมีค่า Ct สูง ส่งผลให้มีค่า Z-score ต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับ โดยการวิเคราะห์สาเหตุเบื้องต้นพบว่าความคลาดเคลื่อนอาจเกี่ยวข้องกับ ความแตกต่างของประสิทธิภาพการสกัด DNA การเตรียมปฏิกิริยา PCR การกำหนด ค่า cut-off Ct หรือความแตกต่างของเครื่องมือและน้ำยาที่ใช้ แม้ว่า จะไม่ส่งผลกระทบต่อผลการประเมินภาพรวมของ เครือข่าย แต่สะท้อนให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของ ระบบ ILC ในการติดตามและแก้ไขปัญหาที่อาจส่งผล ต่อคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งสอดคล้องกับ แนวคิดของการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการที่ ใช้ประเมินความถูกต้อง ความเที่ยง และความสามารถ ของห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะการปฏิบัติงานจริง⁽⁹⁾ อีกทั้งยังสอดคล้องกับรายงานของ Lou และคณะ ที่ระบุว่า การใช้ข้อมูลจาก IQC และ EQA สามารถ ช่วยติดตามกระบวนการ ตรวจสอบของผลตรวจ และเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁶⁾ ผลการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็น ว่าระบบ ILC ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นเครื่องมือ ประกันคุณภาพสำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วย Real-time PCR ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้อง กับศึกษาของ Cunningham และคณะ⁽¹¹⁾ และ Thomson และคณะ⁽¹²⁾ ที่ยืนยันว่าระบบ EQA มีความจำเป็น เมื่อมีความหลากหลายของวิธี PCR ระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งช่วยเสริมสร้างความเชื่อมั่นในข้อมูลเพื่อการ ทางการแพทย์ สนับสนุนการดำเนินงานตาม มาตรฐาน ISO 15189 และเป็นกลไกสำคัญใน การสนับสนุนเป้าหมายการกำจัดโรคไข้มาลาเรียของ ประเทศไทย อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ดำเนินการ เฉพาะในเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต และใช้ตัวอย่างทดสอบที่เป็นการติดเชื้อชนิดเดียว เป็นหลัก ดังนั้น ในอนาคตควรพัฒนาระบบ EQA ให้ครอบคลุมตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อต่ำ ตัวอย่างการ ติดเชื้อแบบผสม และขยายการประเมินไปยังเครือข่าย ห้องปฏิบัติการอื่น ๆ เพื่อยกระดับมาตรฐานการตรวจ

วินิจฉัยมาลาเรียของประเทศให้สอดคล้องกับแนว ทางการประกันคุณภาพทางห้องปฏิบัติการระดับ สากลมากยิ่งขึ้น⁽⁷⁻⁸⁾

สรุป

การศึกษานี้สามารถพัฒนาระบบประเมิน คุณภาพภายนอกโดยใช้การเปรียบเทียบผลระหว่าง ห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory Comparison; ILC) สำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ตัวอย่าง dried blood spot (DBS) ที่พัฒนา จากตัวอย่างผู้ป่วยมาลาเรียจริง ครอบคลุมเชื้อ *Plasmodium* spp. ที่ก่อโรคในมนุษย์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* ซึ่งผ่านการประเมินด้านความเป็น เนื้อเดียวกันและความคงตัวก่อนนำไปใช้ในการ ทดสอบ ผลการประเมินสมรรถนะของ ห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต สังกัดกรมควบคุมโรค จำนวน 10 แห่ง พบว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ สามารถตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียได้อย่างถูกต้อง และมีความสอดคล้องของผลตรวจในระดับสูง โดยมีค่าความไว ความจำเพาะ และความสอดคล้อง ของผลตรวจอยู่ในเกณฑ์ดีมาก สะท้อนให้เห็นถึง ศักยภาพของเครือข่ายห้องปฏิบัติการในการดำเนินการ ตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ได้ อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นมาตรฐานเดียวกัน นอกจากนี้ ระบบ ILC ที่พัฒนาขึ้นยังสามารถใช้เป็น เครื่องมือในการติดตามสมรรถนะของห้องปฏิบัติการ และสนับสนุนการดำเนินงานด้านการประกันคุณภาพ ตามมาตรฐาน ISO 15189 และ ISO 17043 ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ การดำเนินกิจกรรมดังกล่าว ยังช่วยลดการพึ่งพาวัสดุควบคุมคุณภาพจากต่างประเทศ ลดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานของระบบประกัน คุณภาพห้องปฏิบัติการภายในประเทศ เพื่อใช้สนับสนุน การเฝ้าระวังโรคไข้มาลาเรีย และการดำเนินงาน ตามเป้าหมายการกำจัดโรคไข้มาลาเรียได้อย่าง มีประสิทธิภาพ

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการศึกษา

1) ควรนำระบบประเมินคุณภาพภายนอก โดยการใช้การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ILC ที่พัฒนาขึ้นไปใช้เป็นกิจกรรมประจำอย่างต่อเนื่อง ในเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับเขต ด้านโรคติดต่อ นำโดยแมลง สังกัดกรมควบคุมโรค เพื่อใช้ติดตามสมรรถนะของห้องปฏิบัติการ เฝ้าระวังความคลาดเคลื่อนของผลตรวจ และ สนับสนุนการดำเนินงานตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO 15189 และ ISO 17043

2) ควรขยายการเข้าร่วมระบบ EQA และ ILC ไปยังห้องปฏิบัติการเครือข่ายอื่นที่มีการตรวจ วินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี Real-time PCR ได้แก่ ห้องปฏิบัติการในสถาบันการศึกษา โรงพยาบาล มหาวิทยาลัย และหน่วยงานภาครัฐอื่น ๆ เพื่อยกระดับ มาตรฐานการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียของประเทศ ให้มีความสอดคล้องกันมากยิ่งขึ้น

3) ควรกำหนดเกณฑ์การประเมินค่า cycle threshold (Ct) และตัวชี้วัดด้านคุณภาพอื่น ๆ ให้เป็น มาตรฐานเดียวกันในเครือข่ายห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็น ข้อมูลอ้างอิงในการติดตามความถูกต้องและ ความสม่ำเสมอของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ ระหว่างห้องปฏิบัติการ

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาค้างต่อไป

1) ควรพัฒนาตัวอย่างทดสอบให้ครอบคลุม ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อต่ำ (low-density infection) ซึ่งเป็นสถานการณ์ที่พบได้บ่อยในพื้นที่ที่อยู่ใน ระยะกำจัดโรคไข้มาลาเรีย เพื่อประเมินขีดความสามารถ ของห้องปฏิบัติการในการตรวจพบการติดเชื้อระดับต่ำ

2) ควรเพิ่มตัวอย่างการติดเชื้อแบบผสม (mixed-species infection) เช่น *Plasmodium falciparum*/*P. vivax* หรือ *P. knowlesi*/*P. vivax* ในชุดทดสอบ เพื่อประเมินประสิทธิภาพการจำแนก ชนิดเชื้อในสถานการณ์ที่มีความซับซ้อนมากขึ้น

3) ควรศึกษาความคงตัว (stability) ของ ตัวอย่าง dried blood spot (DBS) ในระยะยาว ภายใต้สภาวะการจัดเก็บและการขนส่งที่แตกต่างกัน เพื่อสนับสนุนการนำตัวอย่างไปใช้ในระบบ EQA ระดับประเทศอย่างยั่งยืน

4) ควรมีการติดตามและวิเคราะห์ปัจจัยที่ ส่งผลต่อความแตกต่างของค่า Ct ระหว่าง ห้องปฏิบัติการ เช่น ชนิดของเครื่อง Real-time PCR ชุดน้ำยา วิธีการสกัดสารพันธุกรรม และเกณฑ์การแปลผล เพื่อพัฒนาแนวทางมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัย มาลาเรียด้วยวิธีอณูชีววิทยาในประเทศไทย

5) ควรมีการศึกษาความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ (cost-effectiveness analysis) ของการพัฒนา ระบบ EQA ภายในประเทศเปรียบเทียบกับ การจัดหา ชุดทดสอบหรือวัสดุควบคุมคุณภาพจากต่างประเทศ เพื่อสนับสนุนการวางแผนนโยบายและการขยายผล ในระดับประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. World malaria report 2024 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2024 [cited 2026 Feb 13]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240104440>
2. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Thailand malaria elimination strategy 2017–2026 [Internet]. Bangkok: Department of Disease Control; 2017 [cited 2026 Feb 13]. Available from: <https://ddc.moph.go.th/dvb/pagecontent.php?page=22&dept=dvb> (in Thai)
3. Wang B, Han SS, Cho C, Han JH, Cheng Y, Lee SK, et al. Comparison of microscopy, nested-PCR, and real-time PCR assays using high-throughput screening of pooled samples for diagnosis of malaria in asymptomatic carriers from areas of endemicity in Myanmar. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):1838-45. doi: 10.1128/JCM.03615-13.
4. Deo DA, Herningtyas EH, Intansari US, Perdana TM, Murhandarwati EH, Soesatyo MHNE. Difference between microscopic and PCR examination result for malaria diagnosis and treatment evaluation in Sumba Barat Daya, Indonesia. *Trop Med Infect Dis.* 2022;7(8):153. doi: 10.3390/tropicalmed7080153.

5. Mpina M, Stabler TC, Schindler T, Raso J, Deal A, Acuche Pupu L, et al. Diagnostic performance and comparison of ultrasensitive and conventional rapid diagnostic test, thick blood smear and quantitative PCR for detection of low-density *Plasmodium falciparum* infections during a controlled human malaria infection study in Equatorial Guinea. *Malar J.* 2022;21(1):99. doi: 10.1186/s12936-022-04103-y.
6. Lou Y, Shan Z, Chen Q, Kang F. Intra-laboratory and inter-laboratory variations analysis for HbA1c assays in China: using internal quality control and external quality assessment data. *J Clin Lab Anal.* 2025;39(8). doi: 10.1002/jcla.70036.
7. International Organization for Standardization. ISO 15189:2022 Medical laboratories—Requirements for quality and competence [Internet]. Geneva: International Organization for Standardization; 2022 [cited 2026 Feb 24]. Available from: <https://www.iaclld.com/UpFiles/Documents/2e096ce5-485b-4f22-b7be-e557fb7d06f8.pdf>
8. World Health Organization. Guidelines for malaria molecular testing [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2022 [cited 2026 Feb 13]. Available from: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/06f3d49f-cdce-4a2b-9ad9-a66395f40845/content>
9. Moradian A, Goonatilleke E, Lin TT, Hatten-Beck M, Emrick M, Schepmoes AA, et al. Interlaboratory comparison of antibody-free LC-MS/MS measurements of C-peptide and insulin. *Clin Chem.* 2024;70(6):855-64. doi: 10.1093/clinchem/hvae034.
10. International Organization for Standardization. ISO 17043:2023 Conformity assessment—General requirements for proficiency testing [Internet]. Geneva: International Organization for Standardization; 2023 [cited 2026 Mar 8]. Available from: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/80864/6038a69dfd204c3eb89f1fe3a6aac556/ISO-IEC-17043-2023.pdf>
11. Thomson RM, Cunningham JA, Gatton MM, Murphy SC, Ade MdlP, Ding XC, et al. WHO malaria nucleic acid amplification test external quality assessment scheme: results of eleven distributions over 6 years. *Malar J.* 2025;24:94. doi: 10.1186/s12936-025-05282-0.
12. Cunningham J, Thomson R, Murphy S, Ade MdlP, Ding XC, Incardona S, et al. WHO malaria nucleic acid amplification test external quality assessment scheme: results of distribution programmes one to three. *Malar J.* 2020;19(1):129. doi: 10.1186/s12936-020-03200-0.
13. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5636-43. doi: 10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004.
14. Lee PC, Chong ETJ, Anderios F, Lim YA, Chew CH, Chua KH. Molecular detection of human *Plasmodium* species in Sabah using PlasmoNex™ multiplex PCR and hydrolysis probe real-time PCR. *Malar J.* 2015;14:28. doi: 10.1186/s12936-015-0542-5.
15. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74. doi: 10.2307/2529310.