

การศึกษาค่าความไม่แน่นอนของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down

A study of measurement uncertainty of Real-time RT-PCR for detection of Influenza A virus subtype H5 in chicken samples using Top-down approach

ภมรญา บุทเสน^{1*} อาภาพร ดอกพุด²

Pamornya Buthasane^{1*} Arphaphorn Dokphut²

Abstract

Backgrounds: Measurement uncertainty (MU) based on the top-down approach is crucial for the diagnostic laboratory following the WAOH guideline. Real-time RT-PCR is one of the laboratory methods for detection of influenza A virus subtype H5 in chicken samples used by the National Institute of Animal Health (NIAH). The MU of testing provides a confident result and complies with the ISO/IEC 17025 requirements. The objective is to estimate the MU of real-time RT-PCR for the detection of influenza A virus subtype H5 in different chicken matrices using a top-down approach.

Methods: Influenza virus subtype H5 RNA was diluted in AVE buffer and three different sample matrices: oropharyngeal swab, lung, and chicken meat. Each sample was prepared from ten samples. The cut-off Ct values of real-time RT-PCR in different matrices were determined, and one-way ANOVA was used to compare these cut-off values. Weak positive RNA was collected for evaluating the measurement uncertainty of real-time RT-PCR for detection of Influenza A virus subtype H5 in different chicken matrices using a top-down approach.

Results: The cut-off values of the oropharyngeal swab, lung, and chicken meat were 35, 33, and 36 cycles at the RNA concentration of 1×10^1 , 1×10^2 และ 1×10^2 copies/reaction, respectively. There were statistically significant differences ($p < 0.05$). The expanded uncertainty was 0.0486. And the MU (95% CI) of real-time RT-PCR for detection of influenza A virus subtype H5 in oropharyngeal swab, lung, and chicken meat matrices were 33.25–36.75, 31.25–34.75, and 37.25–40.75 cycles, respectively.

Conclusions: The difference of sample matrices affected the cut-off and the MU range of the real-time RT-PCR technique for detecting influenza A virus subtype H5. The top-down approach can be applied for internal quality control in a veterinary diagnostic laboratory or used as a management guideline for sample collection.

Keywords: Measurement uncertainty, Top-down approach, Real-time RT-PCR, Influenza A virus subtype H5, Sample matrix

¹National Institute of Animal Health, 50/2 Phaholyothin Road, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900 Thailand.

² Upper Northern Veterinary Research and Development Center, Wiang Tan, Hang Chat, Lamphang 52190 Thailand.

* Corresponding author: Tel. 0-2579-8916 Fax. 0-2579-8918 E-mail niah17@dld.go.th

¹สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ 50/2 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง 52190 ประเทศไทย

ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 0-2579-8916 โทรสาร 0-2579-8918 อีเมล Niah17@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty: MU) เป็นหนึ่งในกระบวนการสำคัญสำหรับห้องปฏิบัติการด้านการชันสูตรโรคสัตว์ ซึ่ง World Organisation for Animal Health (WOAH) แนะนำให้หาค่า MU ด้วยวิธี Top-down การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีกด้วยวิธี Real-time RT-PCR เป็นหนึ่งในวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ได้รับการรับรองมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 ดังนั้นจึงต้องมีการประมาณค่า MU ของการทดสอบเพื่อช่วยให้การรายงานผลสามารถทำได้อย่างมั่นใจและเป็นไปตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2017 การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่า MU ของวิธีดังกล่าวในตัวอย่างสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down

วิธีการ: เตรียมสารละลายเจือจาง RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ใน สารละลายบัฟเฟอร์ AVE และ sample matrix ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ ชนิดละ 10 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบหาค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR พร้อมเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า cut-off ในแต่ละ sample matrix ด้วยสถิติ One-way ANOVA จากนั้นคัดเลือกตัวอย่าง weak positive RNA จาก RNA ของเชื้อไวรัสในสารละลายบัฟเฟอร์ AVE มาทดสอบหาค่า MU ของวิธีดังกล่าว ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down

ผล: ค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ใน matrix oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ มีค่าเป็น 35, 33 และ 36 รอบ ที่ความเข้มข้น 1×10^1 , 1×10^2 และ 1×10^2 copies/ reaction ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่า expanded uncertainty ของการทดสอบ เท่ากับ 0.0486 และค่า MU (95% CI) ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ใน matrix oropharyngeal swab ปอด และเนื้อไก่ มีค่า Ct อยู่ระหว่าง 33.30-36.70, 31.4-34.6 และ 34.25-37.75 รอบ ตามลำดับ

สรุป: sample matrix ที่แตกต่างกันจากสิ่งมีชีวิตเดียวกันมีผลทำให้ค่า cut-off และค่า MU (95% CI) ของวิธี Real-time RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ของแต่ละ sample matrix แตกต่างกัน การประมาณค่า MU ด้วยวิธี Top-down สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับขอบข่ายอื่น ๆ หรือใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือก sample matrix ที่เหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ: ค่าความไม่แน่นอน, วิธี Top-down, วิธี Real-time RT-PCR, เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A, Sample matrix

บทนำ

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty, MU) เป็นกระบวนการสำคัญที่ช่วยให้การรายงานผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการมีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากทุกการวัดย่อมเกิดความคลาดเคลื่อนหรือความไม่แน่นอนของการวัดรวมด้วยเสมอ ซึ่งเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น เครื่องมือ วิธีทดสอบ สารทดสอบ ผู้ทดสอบ และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Magnusson *et al.*, 2012; Colling, 2016) ปัจจุบันห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ มีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกหรือไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อยที่สำคัญ โดยเฉพาะสายพันธุ์ H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก ซึ่งเป็นโรคสำคัญที่มีผลกระทบต่อสาธารณสุขและเศรษฐกิจ สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคดังกล่าวทางห้องปฏิบัติการมีวิธีการตรวจหลายวิธี หนึ่งในวิธีที่ World Organisation for Animal Health (WOAH) แนะนำคือการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธี Real-time RT-PCR (WOAH, 2022) เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในเชิงปริมาณ โดยการตัดสินผลการทดสอบจะดูจากค่า Cycle threshold (Ct) ซึ่งในกรณีที่ผลการทดสอบมีค่า Ct ใกล้เคียงกับ เกณฑ์การตัดสินผลการทดสอบ (cut-off) การตัดสินว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรมจะทำได้ยากและกระบวนการสำหรับทดสอบความใช้ได้ของวิธีทาง

PCR นั้นมีอยู่อย่างจำกัด (Hedman *et al.*, 2018) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการประมาณค่า MU ของวิธีการทดสอบร่วมด้วย โดยรายงานผลเป็นช่วงของค่าความไม่แน่นอนของการวัด (MU range) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเพื่อให้สอดคล้องตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017 ที่ว่าห้องปฏิบัติการต้องมีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดสำหรับการทดสอบที่มีการระบุปริมาณ (ISO, 2022)

การประมาณค่า MU มี 2 วิธี ได้แก่ การใช้แผนภูมิแก๊งปลา (Fish-bone diagram) และการคำนวณจากบนลงล่าง (Top-down approach) โดย Fish-bone diagram นั้น เป็นวิธีที่ต้องนำทุกปัจจัยมาคำนวณรวมด้วย เช่น การสอบเทียบเครื่องมือ ผู้ทดสอบ และสภาวะแวดล้อม เป็นต้น จึงเป็นวิธีที่มีความเข้มงวดและมีรูปแบบการคำนวณค่า MU ที่ชัดเจน ทำให้การคำนวณมีความยุ่งยากและสิ้นเปลืองเวลา (Colling, 2016) ส่วนการคำนวณด้วยวิธี Top-down นั้น เป็นวิธีที่สามารถหาข้อมูลได้จากการทำซ้ำในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ ตัวอย่าง weak positive มาคำนวณโดยตรง ไม่ต้องนำรายละเอียดของแหล่งความไม่แน่นอนย่อย ๆ มาคิดร่วมด้วย การคำนวณจึงทำได้ง่าย ในการศึกษาที่ผู้วิจัยเลือกใช้วิธี Top-down เนื่องจากเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการตรวจวินิจฉัยทางสัตวแพทย์ โดยการประเมินค่าความไม่แน่นอนรวม (Combined uncertainty หรือ u_c) ของวิธีทดสอบสามารถใช้เพียงตัวอย่างควบคุมคุณภาพมาตรฐานตรวจสอบขั้นตอนการปฏิบัติงานทั้งหมดได้โดยตรง ซึ่งทั้งสองวิธีมีการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty หรือ U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Colling, 2016)

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 โดยวิธี Real-time RT-PCR ในตัวอย่างสัตว์ปีก เช่น oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ ซึ่งเป็น sample matrix ที่มีความสำคัญต่อการตรวจวินิจฉัย เนื่องจาก oropharyngeal swab และปอด เป็นอวัยวะเป้าหมายหรือตำแหน่งของระบบทางเดินหายใจที่เชื้อไวรัสดังกล่าวใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่ง WOAH แนะนำให้ใช้ตัวอย่างชนิดนี้ในการตรวจวินิจฉัยหาโรคไข้หวัดนก

(WOAH, 2022) ส่วนเนื้อไก่อ้นั้นเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในผลิตภัณฑ์ก่อนส่งไปยังต่างประเทศ โดยการตรวจวินิจฉัยในตัวอย่างทดสอบที่ต่างชนิดกันนี้ อาจส่งผลกระทบต่อค่า cut-off และค่า MU range ของการทดสอบได้ (Trapmann *et al.*, 2007) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประมาณค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ H5 ในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ในสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down เพื่อช่วยให้การรายงานผลในกรณีที่ตัวอย่างตกอยู่ในช่วงที่ไม่สามารถสรุปผลได้ (Inconclusive) สามารถทำได้อย่างมั่นใจ และเปรียบเทียบค่า cut-off ของ sample matrix แต่ละชนิด เพื่อใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกตัวอย่างทดสอบที่เหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างทดสอบจากสัตว์ปีกที่ใช้ตลอดการศึกษานี้มี 3 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ oropharyngeal swab 5 mL ปอด 5 g และเนื้อไก่ 500 g ซึ่งมีเนื้อตัวอย่าง (sample matrix) ที่แตกต่างกัน และมีการเตรียมตัวอย่างแต่ละชนิด ดังนี้ 1) ตัวอย่าง oropharyngeal swab ทำการแยกเอาก้าน swab ออกจากหลอดเก็บตัวอย่าง 2) ตัวอย่างปอด โดยบดให้เซลล์แตก เตรียมตัวอย่างปอดให้อยู่ในรูปของสารละลายเจือจาง 10% ด้วย 1X PBS และ 3) ตัวอย่างเนื้อไก่ที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติกเตรียมโดยวิธี freeze-thaw จำนวนทั้งสิ้น 3 ครั้ง สลับกันที่อุณหภูมิ 37 °C และ -20 °C อุณหภูมิละ 30 นาที แล้วดูดของเหลวจากเนื้อไก่ 5 mL จากนั้น นำสารละลายของ sample matrix ทั้งสามชนิด มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 x g นาน 10 นาที แล้วเก็บเฉพาะของเหลวส่วนบน (supernatant) เก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ใน sample matrix ทั้งสามชนิดที่เตรียมไว้ โดยนำไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยา

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) และตรวจด้วยวิธี Real-time RT-PCR ตามการศึกษาของ Slomka *et al.* (2007) โดยตัวอย่างทุกชนิดจะต้องให้ผลเป็นลบก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การสร้าง RNA ของเชื้อไวรัส

สกัดสารพันธุกรรมชนิด RNA ของเชื้อไวรัสอ้างอิงคือ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 (A/chicken/Thailand/73/2004) ด้วยชุดน้ำยา QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) แล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตรงตำแหน่งยีน haemagglutinin โดยวิธี RT-PCR (ปรับปรุงจาก Slomka *et al.*, 2007) และทำให้ PCR product บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา FavorPrep™ GEL/ PCR Purification (Favorgen, Taiwan) ก่อนนำชิ้นส่วน DNA ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับตัวนำ (vector) ชนิดพลาสมิด ด้วยชุดน้ำยา pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA) เพื่อสร้างเป็น recombinant DNA จากนั้นนำ recombinant DNA ที่ได้เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (Invitrogen, USA) คัดเลือกโคโลนีโดยวิธี blue-white colony screening (Knoche *et al.*, 1999) และเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth ทำการสกัดพลาสมิดที่มี recombinant DNA อยู่ภายใน ด้วยชุดน้ำยา GF-1 Plasmid DNA Extraction (Vivantis, Malaysia) แล้วเปลี่ยน plasmid DNA ให้กลับมาเป็น RNA โดยใช้ MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

การเตรียม RNA-spiked sample

นำ RNA ของเชื้อไวรัสอ้างอิงที่เตรียมได้ มาตรวจวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) แล้วคำนวณหาจำนวน RNA copy จากค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ โดยใช้สูตรของ Whelan *et al.* (2003) จากนั้นทำการ spike RNA ดังกล่าว 10 µL ลงไปใน sample matrix ทุกชนิดที่ได้เตรียมไว้ หลอดละ 90 µL ได้แก่

oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ ซึ่งผ่านการสกัดสารพันธุกรรมแล้ว รวมทั้งตัวอย่างที่ไม่มี sample matrix คือ สารละลายบัฟเฟอร์การชะล้าง (AVE) (Qiagen, Germany) ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของ RNase-free water และ 0.04% NaN₃ (Sodium azide) และปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 × 10⁹ copies/µL ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ AVE จากนั้นทำการเจือจาง RNA ใน sample matrix แต่ละชนิดแบบ ten-fold serial dilution จำนวนชนิดละ 10 ความเข้มข้น เพื่อให้ได้ RNA-spiked sample ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน สำหรับนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของการทดสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 โดยวิธี Real-time RT-PCR ต่อไป

การทดสอบโดยวิธี Real-time RT-PCR

ทดสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 โดยวิธี Real-time RT-PCR โดยใช้ชุด primers และ probe ตามการศึกษาของ Slomka *et al.* (2007) (ตารางที่ 1) และใช้ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) (ตารางที่ 2) โดยตั้งค่าสภาวะการทดสอบ ดังนี้ ขั้นตอน Reverse transcription 50 °C นาน 30 นาที จำนวน 1 รอบ, Initial activation 95 °C นาน 15 นาที จำนวน 1 รอบ และ Denaturation 95 °C นาน 10 วินาที, Annealing 54 °C นาน 30 วินาที, Extension 72 °C นาน 10 วินาที จำนวน 40 รอบ โดยใช้เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)

ตารางที่ 1 ข้อมูล Primers และ Probe ที่จำเพาะต่อยีน haemagglutinin ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 สำหรับวิธี Real-time RT-PCR (Slomka *et al.*, 2007)

Name	Type	Sequence (5'→3')
H5LH1	Forward	ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G
H5RH1	Reverse	AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC
H5PRO	Probe	FAM-TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-TAMRA

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Real-time RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5

Component	Volume (µL)/ reaction	Final concentration
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer*	5	1X
dNTP Mix (containing 10 mM of each dNTP)	1	400 µM of each dNTP
H5LH1 Primers (50 µM)	0.2	0.4 µM
H5RH1 Primers (50 µM)	0.2	0.4 µM
H5PRO Probe (30 µM)	0.25	0.3 µM
25 mM MgCl ₂	1.25	3.75 mM
RNase inhibitor (40 U/µL)	1	1.6 U/µL
RNase-free water	14.1	-
Template RNA	2 µL	
Total volume	25 µL	

การสร้างกราฟมาตรฐานของวิธี Real-time RT-PCR

ทำการทดสอบตัวอย่างสารละลายเชื้อจาก RNA ที่อยู่ใน sample matrix ทั้ง 3 ชนิด และในสารละลายบัฟเฟอร์ AVE ด้วยวิธี Real-time RT-PCR ที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำผลที่ได้มาสร้างสมการเส้นตรงระหว่างปริมาณ RNA กับค่า Ct ของวิธี Real-time RT-PCR จากนั้น คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และ ค่า %Efficiency (%E) โดยค่า R^2 ที่ได้ จะนำมาใช้ในการตรวจสอบว่าการเชื้อจาก RNA เป็นไปอย่างเหมาะสม มีเกณฑ์ที่ยอมรับคือ ต้องให้ค่า $R^2 > 0.95$ (Pestana *et al.*, 2010) และค่า %E ใช้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของ primers และ probe ในปฏิกิริยา PCR มีเกณฑ์ที่ยอมรับคือ $90 < \%E < 110$ โดยกรณีค่า $\%E \leq 90$ หมายถึง มีปัญหาการออกแบบ primer หรือ อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR และกรณีค่า $\%E \geq 110$ หมายถึง มีความผิดพลาดด้านเทคนิคการทำการทดสอบ (technical error) เช่น การใช้ปิเปตตูดปล่อยของเหลวผิดพลาดในการทำการเชื้อจากสลิปเท่า การเกิด nonspecific primer หรือการเกิด primer dimer (Raymaekers *et al.*, 2009; Pestana *et al.*, 2010)

การหาค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ในแต่ละ sample matrix

จากกราฟมาตรฐานที่ได้ เลือกช่วงความเข้มข้นของสารละลายเชื้อจาก RNA ที่ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงค่า cut-off จำนวน 3 ความเข้มข้น มาทำการทดสอบด้วยวิธี Real-time RT-PCR อีกครั้ง ที่ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของ Ct จากความเข้มข้นที่ให้ผลบวกมากกว่า 95% หรือให้ผลบวกทั้ง 10 ครั้งจากทั้งสาม sample matrix แล้วกำหนดให้เป็นค่า cut-off ใหม่ ของแต่ละ sample matrix จากค่า cut-off เดิม คือที่ Ct 36 รอบ (Slomka *et al.*, 2007) จากนั้น เปรียบเทียบความแตกต่างค่า cut-off ของ sample matrix ทั้งสามชนิด โดยใช้สถิติ One-way analysis of variance (One-way ANOVA)

การคัดเลือกตัวอย่าง weak positive RNA

จากกราฟมาตรฐานที่ได้ คัดเลือก weak positive RNA โดยเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ AVE เนื่องจากไม่มี inhibitor ใด ๆ เจือปน ในการหาค่า expanded uncertainty ของวิธีทดสอบ โดยเลือกช่วงความเข้มข้นที่มีค่า Ct อยู่ระหว่าง 29 ถึง 33 รอบ (Slomka *et al.*, 2007)

การหาค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR

ประมาณค่า MU จาก weak positive sample ด้วยวิธี Top-down (Colling, 2016) โดยนำตัวอย่าง weak positive RNA จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ได้จากขั้นตอนการคัดเลือกตัวอย่าง weak positive RNA มาทำการทดสอบด้วยวิธี Real-time RT-PCR จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้น คำนวณหาค่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard of deviation หรือ rsd) โดยคิดเปอร์เซ็นต์จากอัตราส่วนระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน กับค่าเฉลี่ย ดังสูตร

$$rsd = \frac{SD}{Mean}$$

สำหรับวิธี Top-down กำหนดให้ค่า combined standard uncertainty มีค่าเท่ากับค่า rsd จากการทำซ้ำ (Zilli, 2013) จากนั้น คำนวณค่า expanded uncertainty ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k=2) ดังสูตร

$$\text{Expanded uncertainty } U_{(95\% \text{ CI})} = 2 \times \text{rsd}$$

นำค่า expanded uncertainty คูณค่า cut-off ของ sample matrix แต่ละชนิด ได้เป็นค่า MU ของ sample matrix ต่าง ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (95% CI) ดังสมการ

$$\text{MU}_{(95\% \text{ CI})} = \text{cut-off} \times 2\text{rsd}$$

ค่า MU ของ sample matrix ต่าง ๆ นำมาวิเคราะห์ร่วมกับค่า cut-off ของ sample matrix แต่ละชนิด ได้เป็น inconclusive range ของ sample matrix แต่ละชนิด ดังสมการ

$$\text{Inconclusive range} = \text{cut-off} \pm \text{MU}_{(95\% \text{ CI})}$$

ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 โดยวิธี Real-time RT-PCR ใน sample matrix ทั้งสามชนิด ให้ผลเป็นลบทั้งหมด

ความเข้มข้นของ RNA

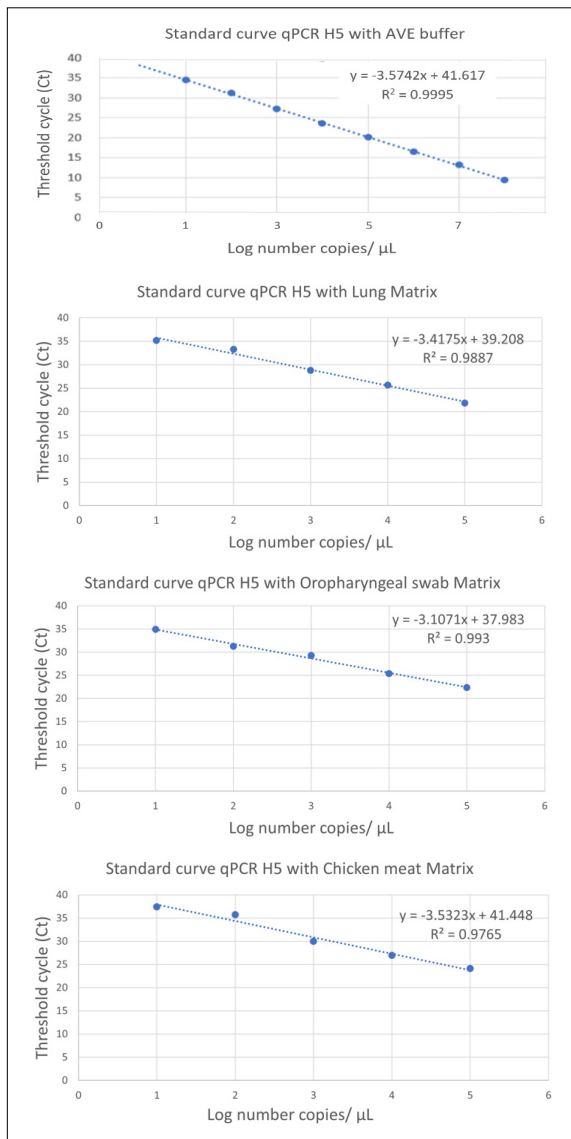
ความเข้มข้นของ RNA ของเชื้อไวรัสอ้างอิงที่เตรียมจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 67.6 ng/μL หรือ 1.6 × 10¹⁰ copies/μL และจากตารางที่ 3 พบว่า ความเข้มข้นสุดท้ายที่ทุก sample matrix ให้ผลเป็นบวกและลบเท่ากับ 1×10² และ 1×10⁰ copies/ reaction ตามลำดับ ดังนั้น จึงเลือกใช้สารละลายเจือจาง RNA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10⁰ ถึง 1×10² copies/ reaction ในการหาค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ในแต่ละ sample matrix ต่อไป

ตารางที่ 3 ผล Real-time RT-PCR ของสารละลายเจือจางตัวอย่าง RNA-spiked sample ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างสัตว์ปีกชนิดต่าง ๆ

Dilution	RNA-spiked sample (copies/reaction)	Ct (mean ± SD)				Result			
		A	B	C	D	A	B	C	D
Undiluted	1×10 ⁹	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10 ⁻¹	1×10 ⁸	9.86±0.37	NA	NA	NA	+++	NA	NA	NA
10 ⁻²	1×10 ⁷	14.26±0.61	NA	NA	NA	+++	NA	NA	NA
10 ⁻³	1×10 ⁶	16.03±0.07	NA	NA	NA	+++	NA	NA	NA
10 ⁻⁴	1×10 ⁵	20.22±0.39	22.36±0.03	21.86±0.15	24.11±0.11	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁵	1×10 ⁴	24.00±0.24	25.40±0.05	25.67±0.01	27.00±0.73	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁶	1×10 ³	26.99±0.18	29.31±0.09	28.81±0.19	30.00±0.35	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁷	1×10 ²	31.82±0.44	31.89±0.28	33.28±0.68	35.73±0.77	+++	+++	+++	+++
10 ⁻⁸	1×10 ¹	34.51±0.77	34.95±0.93	35.15±3.32	37.41±0.21	+++	+++	++-	++-
10 ⁻⁹	1×10 ⁰	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	---	---	---	---

Note A= AVE buffer, B= Oropharyngeal swab, C= Lung, D= Chicken meat, NA= not applicable Real-time RT-PCR

จากผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 1 เมื่อนำผลเฉลี่ยของค่า Ct แต่ละความเข้มข้น มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 กับค่า Ct พบว่าในสารละลายบัฟเฟอร์ AVE, oropharyngeal swab, ปอด และ เนื้อไก่ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9995, 0.993, 0.9887 และ 0.9765 ตามลำดับ และมีค่า %E เท่ากับ 90.45%, 109.8%, 96.16% และ 91.91% ตามลำดับ ซึ่งทั้งค่า R^2 และ % ของทุก sample matrix ที่ทำการทดสอบมีค่าไม่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด สรุปได้ว่าการเจือจาง RNA เป็นไปอย่างเหมาะสม และ primers และ probe ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของวิธี Real-time RT-PCR การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในสารละลายบัฟเฟอร์ AVE, oropharyngeal swab, ปอด และ เนื้อไก่

ผลการหาค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ในแต่ละ sample matrix

พบว่าสารละลายเจือจาง RNA ที่ความเข้มข้น 1×10^0 ถึง 1×10^2 copies/reaction สารละลายบัฟเฟอร์ AVE, oropharyngeal swab, ปอด และ เนื้อไก่ มีค่า cut-off อยู่ที่ 35, 35, 33 และ 36 รอบ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^1 , 1×10^1 , 1×10^2 และ 1×10^2 copies/reaction ตามลำดับ และพบว่า ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างค่า cut-off ระหว่าง oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ ค่า cut-off ของตัวอย่าง oropharyngeal swab กับสารละลายบัฟเฟอร์ AVE ไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าค่าความไว (sensitivity) ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 สูงที่สุดใน oropharyngeal swab เมื่อเทียบกับ ปอด และเนื้อไก่ เนื่องจากใน oropharyngeal swab สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นของเชื้อต่ำที่สุด คือ 1×10^1 copies/reaction ขณะที่ใน sample matrix ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังอาจกล่าวได้ว่า ใน oropharyngeal swab มีแนวโน้มที่จะมีการปนเปื้อนของตัวยับยั้ง (inhibitor) น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับ sample matrix อื่น ๆ เนื่องจาก ค่า cut-off ของ oropharyngeal swab กับตัวอย่างบัฟเฟอร์ AVE ที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่แตกต่างกัน อีกทั้งการปนเปื้อนของตัวยับยั้งต่าง ๆ ใน sample matrix จะไปรบกวนขั้นตอนต่าง ๆ ในปฏิกิริยา PCR ส่งผลทำให้ค่า sensitivity ในการตรวจลดลง (Schrader *et al.*, 2012) และเนื่องจากในปอดและเนื้อไก่ มักพบสารอินทรีย์ที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้แก่ สารอินทรีย์ชนิด melanin ในเนื้อเยื่อปอด (Rådström *et al.*, 2004) และสารอินทรีย์ชนิด myoglobin ในกล้ามเนื้อ (Bélec *et al.*, 1998) ซึ่งตัวยับยั้งทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว มีกลไกในการยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอ (reverse transcription) และยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA polymerization) ในขั้น extension ของปฏิกิริยา PCR

นอกจากนี้สารอินทรีย์ชนิด melanin ยังสามารถเกิดการ cross-linking กับกรดนิวคลีอิก ทำให้คุณสมบัติของ กรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไป ทำให้สายทั้งสองของดีเอ็นเอ นั้นไม่สามารถแยกตัวออกจากกันในขณะที่เกิดกระบวนการ จำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) (Abu Al-Soud and Rådström, 2000; Schrader *et al.*, 2012)

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบค่า cut-off ของวิธี Real-time RT-PCR ในตัวอย่างแต่ละชนิด ด้วยสถิติ One-way ANOVA

Type of sample	Cut-off (Ct)	RNA concentration (copies/reaction)
AVE buffer	35 ^a	1×10 ¹
Oropharyngeal swabs	35 ^a	1×10 ¹
Lung	33 ^b	1×10 ²
Chicken meat	36 ^c	1×10 ²

Note Values with the different letters were significantly different ($p < 0.05$).

ผลการคัดเลือกตัวอย่าง weak positive RNA และ ผลการคำนวณค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR

จากตารางที่ 3 ตัวอย่าง weak positive RNA ที่ ถูกคัดเลือกมาใช้ในการหาค่า expanded uncertainty ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัส ไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจาก สัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down ได้จากสารละลายบัฟเฟอร์ AVE ที่ dilution 10⁻⁷ มีปริมาณ RNA ของเชื้อไวรัส เท่ากับ 1×10² copies/reaction จากผลดังกล่าวพบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ AVE มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ เป็นตัวแทนการหาค่า expanded uncertainty ของการ ทดสอบจริง เนื่องจาก dilution สุดท้ายที่ทุกตัวอย่างให้ ผลเป็นบวก สารละลายบัฟเฟอร์ AVE มีค่าเฉลี่ย Ct ต่ำสุด คือ 32 รอบ เมื่อเทียบกับ sample matrix อื่น ๆ การเลือกใช้ sample matrix เพียงชนิดเดียวมาเป็น ตัวแทนในการหาค่า expanded uncertainty สามารถ ทำได้ แต่การหาค่า expanded uncertainty แยกใน แต่ละ sample matrix จะช่วยเพิ่มค่าความแม่นยำมาก ยิ่งขึ้น (Ljevaković-Musladin, 2020)

จากตารางที่ 5 แสดงผลการคำนวณค่า MU ของ วิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัส ไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจาก สัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down พบว่า ค่า Ct เฉลี่ยของ ตัวอย่าง weak positive RNA จำนวน 1 ตัวอย่าง เท่ากับ 30.12 รอบและมีค่า expanded uncertainty ซึ่งเป็น ค่า threshold selection (CI95) เพื่อนำไปใช้ปรับ threshold line เลื่อนขึ้นหรือลง เท่ากับ 0.0486 ซึ่งเป็น ค่าความไม่แน่นอนที่มาจากค่า Ct ของตัวอย่าง ทดสอบในกระบวนการ Real-time RT-PCR เป็นหลัก ในขณะที่ค่า MU จากแหล่งอื่น ๆ เช่น กระบวนการสกัด DNA จากตัวอย่างทดสอบถูกนับรวมอยู่ในค่าดังกล่าว เรียบร้อยแล้ว และไม่มีผลกระทบต่อค่า Ct แต่อย่างใด (Love *et al.*, 2006)

ค่า Expanded uncertainty ที่ได้ นำมาใช้ประเมิน ค่าของ MU (95%CI) ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ใน sample matrix แต่ละชนิด ดังตารางที่ 6 พบว่า matrix oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ มีค่า MU (95%CI) ที่ Ct ระหว่าง 33.30-36.70 31.4-34.6 และ 34.25-37.75 รอบ ตามลำดับ ดังนั้น หากผลการ ทดสอบที่ได้ตกอยู่ในช่วงดังกล่าว ให้แปลผลเป็น inconclusive และควรมีการทดสอบซ้ำโดยผู้ทดสอบ คนเดิม ใช้วิธีทดสอบเดิมแต่เปลี่ยนตัวอย่างใหม่ หรือ เปลี่ยนวิธีทดสอบ โดยใช้ตัวอย่างเดิมเพื่อยืนยันผลการ ทดสอบอีกครั้งก่อนสรุปผล

ตารางที่ 5 ผลการคำนวณค่า MU ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่าง จากสัตว์ปีก ด้วยวิธี Top-down

Measurement uncertainty	
Mean Ct (cycle)	30.116
Standard deviation (SD)	0.7317
Relative standard deviation (rsd)	0.0243
Coefficient variation (%CV)	2.43
Expanded uncertainty U _{95% CI} (2rsd)	0.0486

ตารางที่ 6 ค่า MU range ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก และการแปลผลการทดสอบ ของ sample matrix แต่ละชนิด

Sample matrix	Cut-off x 2rsd	MU range (95% CI)	Results (Ct)		
			Positive	Inconclusive	Negative
AVE buffer	1.70	35 ± 1.70	< 33.30	33.30 - 36.70	> 36.70
Oropharyngeal swab	1.70	35 ± 1.70	< 33.30	33.30 - 36.70	> 36.70
Lung	1.60	33 ± 1.60	< 31.40	31.40 - 34.60	> 34.60
Chicken meat	1.75	36 ± 1.75	< 34.25	34.25 - 37.75	> 37.75

จากผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ใน sample matrix ต่างชนิดกัน มีผลทำให้ค่า cut-off และ MU range แตกต่างกันไป แม้จะเป็นสัตว์ชนิดเดียวกัน ทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน หรือเครื่องมือเดียวกันก็ตาม เนื่องจากใน sample matrix ต่างชนิดกัน ย่อมมีตัวยับยั้งปฏิกิริยาต่างกัน ผลการศึกษาดังกล่าว จึงเป็นประโยชน์แก่ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือก sample matrix ที่เหมาะสม

ผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปต่อยอดศึกษาถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจส่งผลต่อค่า MU ได้ เช่น การใช้ชุดสกัดที่แตกต่างกัน หรือวิธีการคำนวณค่า MU ที่แตกต่างกัน เป็นต้น เพื่อเป็นแนวทางในการลด MU ของวิธีทดสอบนั้น ๆ ต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาข้างต้น พบว่า ค่า expanded uncertainty ของวิธี Real-time RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีก คือ 0.0486 และค่า MU range (95%CI) ของ matrix oropharyngeal swab, ปอด และเนื้อไก่ มีค่า Ct ระหว่าง 33.30-36.70 31.4-34.6 และ 34.25-37.75 รอบ ตามลำดับ ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกชนิดของ sample matrix สำหรับส่งตรวจ เช่น เลือกตัวอย่างที่มีช่วงค่า MU ต่ำ นอกจากนี้ การประมาณค่า MU ด้วยวิธี Top-down สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับขอบข่ายอื่น ๆ ที่เป็นการทดสอบเชิงปริมาณเพื่อควบคุมคุณภาพผลการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการด้านการชันสูตรโรคสัตว์ ช่วยให้การรายงานผลในกรณีที่ตัวอย่างตกอยู่ในช่วง inconclusive สามารถทำได้อย่างมั่นใจ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์บัณฑิต นวลศรีฉาย หัวหน้ากลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเป็นอย่างสูง ที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาในการทำวิจัย ตลอดจนวิเคราะห์ผลการทดสอบ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาที่ช่วยเตรียมและทดสอบตัวอย่าง และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนการค้นคว้าข้อมูลต่าง ๆ รวมทั้งแผนและผลการตรวจสอบ/ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

Abu, A.W. and Rådström, P. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J. Clin. Microbiol.* 38 (12): 4463-4470.

Bélec, L., Authier, J., Eliezer-Vanerot, M.C., Piédouillet, C., Mohamed, A.S. and Gherardi, R.K. 1998. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve.* 21(8): 1064-1067.

Colling, A. 2016. Measurement of uncertainty in veterinary diagnostic testing. [Online]. Available: <http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/animal/ah/v/measurements-uncertainty-vet-diagnostic-procedures.pdf>. Accessed July 20, 2022.

Hedman, J., Lavander, M., Salomonsson, E.N. et al. 2018. Validation guidelines for PCR workflows in bioterrorism preparedness, food safety and forensics. *Accred. Qual. Assur.* 23: 133-144. doi.10.1007/s00769-018-1319-7

International Organization for Standardization (ISO). 2022. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Retrieved from ISO/IEC 17025:2017 (imed.ir).

Knoche, K. and Kephart, D. 1999. Cloning blunt-end Pfu DNA Polymerase-generated PCR fragments into pGEM®-T Vector Systems. *Promega Notes.* 71 (10):1-5.

- Ljevaković-Musladin, I. 2020. Measurement Uncertainty According to ISO 19036: 2019. Proceedings in “17th IMEKO TC 10 and EUROLAB Virtual Conference. Global Trends in Testing, Diagnostics & Inspection for 2030” between October 20-22, 2020. p. 302-308.
- Love, J.L., Scholes, P., Gilpin, B., Savill, M., Lin, S. and Samuel, L. 2006. Evaluation of uncertainty in quantitative real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* 67 (2): 349-356.
- Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H. and Krysell, M. 2012. “Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental.” [Online]. Available: https://dastmardi.ir/wp-content/uploads/2016/12/nt_tr_537_ed3_1_English_Handbook-for-Calculation-of-Measurement-uncertainty-in-environmental-laboratories.pdf. Accessed February 3, 2023.
- Pestana, E., Belak, S., Diallo, A., Crowther, J. R. & Viljoen, G.J. 2010. “Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics-real time PCR applications.” 1-310. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3132-7>. Accessed July 20, 2022.
- Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M. and Löfström, C. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. biotech.* 26 (2): 133-146.
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. and Cartuyvels, R. 2009. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin. Lab. Anal.* 23 (3): 145-151.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johne, R. 2012. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113 (5): 1014-1026.
- Slomka, M.J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S. and Brown, I.H. 2007. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian. Dis.* 51 (1 Suppl): 373-377.
- Trapmann, S., Burns, M., Broll, H., Macarthur, R., Wood, R.K.S. and Žel, J. 2007. Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. Office for official publications of the European communities. [Online]. Available: <https://core.ac.uk/download/pdf/38619315.pdf>. Accessed February 3, 2023.
- Whelan, J.A., Russell, N.B. and Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol Methods.* 278 (1-2): 261-269.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022. “Chapter 3.3.4 Avian Influenza (Including Infection with High Pathogenicity Avian Influenza viruses), version adopted in May 2021.” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. [Online]. Available: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf. Accessed July 20, 2022.
- Zilli, M. 2013. A Practical Guide to the Calculation of Uncertainty of Measurement. *The Open Toxicology Journal.* 6: 20-26.