

**โครงการ R2R/TA**  
**งานอณูพยาธิวิทยา (Molecular Pathology)**  
**ประจำปีงบประมาณ 2566**

- 1. ชื่อโครงการ:** การเปรียบเทียบ 3 ชุดน้ำยาทดสอบ *KRAS* gene mutation  
Comparison of 3 commercial kits to investigate *KRAS* gene mutation

**ผู้ดำเนินการ:**

**ที่ปรึกษาโครงการ**

นายแพทย์พงษ์ภา ประสงค์อุปถัมภ์

**ผู้ดำเนินการและรับผิดชอบโครงการ**

นายภาณุพล ฤทธิประวัติ

**ผู้ร่วมโครงการ**

น.ส. สุมลรัตน์ ปานทอง

น.ส. พุทธิชานันท์ เกิดพร

น.ส. ภัทรกัญย์ มีศิริ

นาย เมธพนธ์ พุฒิชชาติ

น.ส. กุลชา วังทะพันธ์

**หน่วยงานที่รับผิดชอบ** งานอณูพยาธิวิทยา กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา

**2. หลักการและเหตุผล/แนวคิดในการพัฒนาคุณภาพงาน**

การตรวจโรคมะเร็งลำไส้มีหลายวิธีในขณะนี้ หนึ่งในนั้นคือการตรวจกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นรายการตรวจวิเคราะห์ของงานอณูพยาธิวิทยาในปัจจุบัน เนื่องด้วยจำนวนที่ส่งตรวจมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ราคาต้นทุนต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง, การเตรียม-วิเคราะห์ผลของชุดน้ำยาในปัจจุบันใช้เวลานานในแต่ละตัวอย่าง ไม่สามารถรองรับปริมาณตัวอย่างได้เท่าที่ควร

งานอณูพยาธิวิทยาได้ทำการสืบค้นหาชุดน้ำยาทดสอบอื่นๆเพื่อมาประกอบการเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน *KRAS* ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยชุดน้ำยาทดสอบปัจจุบันคือ AmoyDx® *KRAS* mutation detection kit เปรียบเทียบกับ Roche® *KRAS* v2 mutation test (LSR) และ Easy PGX® ready *KRAS* ที่ช่วยทำงานง่ายขึ้น, ลดขั้นตอนหรือระยะเวลาการทำงาน, ลดต้นทุนค่าใช้จ่าย, และรองรับจำนวนตัวอย่างที่เพิ่มมากขึ้นต่อไป

**3. วัตถุประสงค์**

เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์และคุณภาพของชุดน้ำยาทดสอบ *KRAS* gene mutation ทั้ง 3 ชุดน้ำยา ด้วยเทคนิค Real-time PCR

**4. ประโยชน์ที่จะได้รับ**

สามารถเลือกใช้ชุดน้ำยาทดสอบ KRAS gene mutation ที่สะดวกเหมาะสมในการนำไปให้บริการ  
ตรวจวิเคราะห์ต่อไปของงานอณูพยาธิวิทยา สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์

## 5. ระยะเวลาในการดำเนินการ

ตุลาคม 2565 – กันยายน 2566

## 6. กิจกรรมดำเนินการ

กิจกรรม	ปีงบประมาณ 2566					
	ต.ค. - พ.ย.	ธ.ค. - ม.ค.	ก.พ. - มี.ค.	เม.ย. - พ.ค.	มิ.ย. - ก.ค.	ส.ค. - ก.ย.
1. ค้นคว้าข้อมูล	←→					
2. เขียนโครงการ		←→				
3. ทดสอบด้วยชุดน้ำยา AmoyDx® KRAS mutation detection kit 30 ตัวอย่าง			←→			
4. ทดสอบด้วยชุดน้ำยา Roche® KRAS v2 mutation test (LSR) 30 ตัวอย่าง				←→		
5. ทดสอบด้วยชุดน้ำยา Easy PGX® ready KRAS 18 ตัวอย่าง					←→	
6. สรุปผลการทดลอง						←→

## 7. งบประมาณของโครงการวิจัย

ไม่มีค่าใช้จ่าย

หมายเหตุ : น้ำยาตรวจวิเคราะห์ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท

## 8. วิธีการและผลการทดลอง

8.1 ทำการสุ่มคัดเลือกตัวอย่างจากบล็อกชิ้นเนื้อที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ยีน KRAS ของงานอณูพยาธิวิทยา สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ จำนวน 30 ตัวอย่าง

8.2 ตัดชิ้นเนื้อจากบล็อกพาราฟิน 5 µm จำนวน 8-10 แผ่น ใส่หลอด 1.5 ml. ทำการ Deparaffinization ชิ้นเนื้อ จากนั้นทำการสกัด DNA ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit สกัดทำย่น้ำตัวอย่าง DNA ที่สกัดแล้วเสร็จ วัดปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่อง Nanodrop และปรับความเข้มข้นแต่ละตัวอย่างที่ 2ng/µl เพื่อเตรียมทดสอบตรวจวิเคราะห์ต่อไป

8.3 ทำการตรวจวิเคราะห์ 3 ชุดน้ำยาทดสอบ KRAS gene mutation ด้วยเทคนิค Real-time PCR เตรียมน้ำยา Master mix ของชุดน้ำยา AmoyDx® KRAS mutation detection kit 30 ตัวอย่าง, Roche® KRAS v2 mutation test (LSR) 30 ตัวอย่าง, และ Easy PGX® ready KRAS 18 ตัวอย่าง จากนั้นลงเครื่องและวิเคราะห์แปลผล ตามลำดับ

## 9. ผลการดำเนินการ/ผลการทดลอง

ผลการทดสอบตรวจวิเคราะห์ KRAS gene mutation ทั้ง 3 ชุดน้ำยาโดยเทคนิค Real-time PCR ชุดน้ำยา Easy PGX® ให้ผลไม่ตรงกัน 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 5 ให้ผลเป็น Wild type (WT) ส่วนชุดน้ำยา

Roche® KRAS v2 mutation test (LSR) และ Easy PGX® ready KRAS ให้ผลเป็น G13C และ G13X ตามลำดับ ในตัวอย่างที่ 8 ให้ผลเป็น Invalid อีก2ชุดน้ำยาให้ผลเป็น WT , และสุดท้ายตัวอย่างที่ 16 ให้ผลเป็น Invalid อีกทั้ง2น้ำยาให้ผลเป็น G12V และ G12X ตามลำดับแสดงในตารางที่1

**ตารางที่ 1** ผลการทดสอบตรวจวิเคราะห์ KRAS gene mutation ของ 3 ชุดน้ำยา โดยเทคนิคReal-time PCR

No.	% Tumor cell	KRAS gene mutation		
		AmoyDx®	Roche®	Easy PGX®
1	30	WT	WT	WT
2	30	G12R	G12X	G12X
3	50	WT	WT	WT
4	40	G12C	G12C	G12C/G13D
5	40	G13C	G13X	WT
6	30	WT	WT	WT
7	40	WT	WT	WT
8	50	WT	WT	Invalid
9	40	WT	WT	N/A
10	20	G12C	G12C	N/A
11	30	WT	WT	N/A
12	40	G13D	G13X	N/A
13	40	Exon4(K117X/A146X)	A146X	N/A
14	40	G13D	G13X	N/A
15	40	WT	WT	WT
16	40	G12V	G12X	Invalid
17	40	Exon3(A59X/Q61X)	Q61X	N/A
18	40	WT	WT	N/A
19	20	G12D/A146X	G12X/A146X	G12X/A146X
20	30	WT	WT	N/A
21	20	G12S	G12X/Q61X	G12X/Q61X
22	30	WT	WT	N/A
23	50	Exon3(A59X/Q61X)	A59X/A146X	A59X/A146X
24	50	G12A	G12X	N/A
25	30	Exon4(K117X/A146X)	A146X	N/A
26	EQA	WT	WT	WT
27	EQA	WT	WT	WT
28	EQA	G12D/G13D/Q61H/A146T	G12X/G13X/Q61X/A146X	G12X/G13D/Q61X/A146X
29	EQA	WT	WT	WT

30	EQA	G13D	G13X	G13D
----	-----	------	------	------

WT = Wild type

N/A = Not Applicable

X = Not identified type

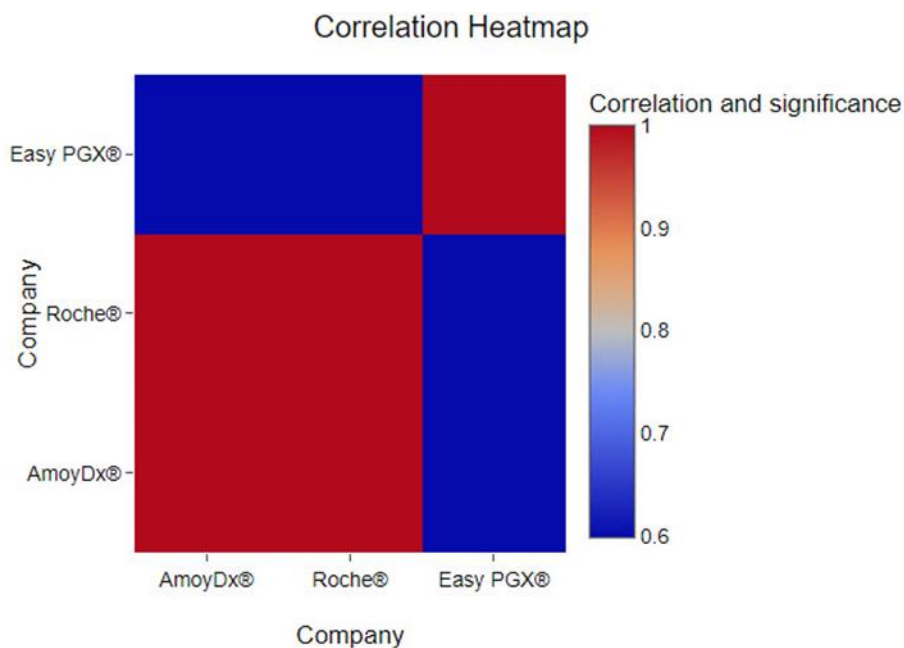
EQA = External Quality Assessment

จากตารางที่ 1 ทำการทดสอบทางสถิติ Correlation ของชุดน้ำยาทั้ง 3 ผลแสดงว่าชุดน้ำยา AmoyDx® KRAS mutation detection kit และ Roche® KRAS v2 mutation test (LSR) มีความสอดคล้องกันมากอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 2 และ รูปที่ 1

**ตารางที่ 2** ตารางคำนวณสถิติ Correlation เปรียบเทียบชุดน้ำยาทั้ง 3

	<b>AmoyDx®</b>	<b>Roche®</b>	<b>Easy PGX®</b>
<b>AmoyDx®</b>	1		
<b>Roche®</b>	1	1	
<b>Easy PGX®</b>	0.59805036	0.59805036	1

**รูปที่ 1** Correlation Heatmap แสดงการเปรียบเทียบชุดน้ำยาทั้ง 3



## 10. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบเปรียบเทียบวิเคราะห์ชุดน้ำยาทั้ง 3 และตารางที่ 3 ทำให้รู้ข้อจำกัดที่สำคัญต่างๆ โดยเฉพาะพบว่าชุดน้ำยา Easy PGX® ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์รูปแบบการกลาย G13C ได้ ดังนั้นแล้วทำให้งานอณูพยาธิวิทยาที่กำหนดการที่จะเปลี่ยนไปใช้ชุดน้ำยา Roche® ที่สามารถเตรียมจำนวนหลอด Master

mix ต่อตัวอย่างเพียงแค่ 3 หลอด และลงเครื่องได้ถึง 30 ตัวอย่าง ต่อรอบ รวมทั้งการแปลผลแบบอัตโนมัติ  
 สุดท้ายค่าใช้จ่ายต้นทุนที่ถูกลงเมื่อเทียบกับชุดน้ำยาที่ใช้อยู่ปัจจุบัน

**ตารางที่ 3** ตารางเปรียบเทียบคุณสมบัติและประสิทธิภาพของ 3 ชุดน้ำยา

List	AmoyDx®	Roche®	Easy PGX®
No. of Master mix tube per sample	12	3	8
DNA input	10ng. /Well	50ng. /Well	12.5ng. /Well
No. of case per run	6	32	10
Sensitivity (limit of detection)	1-5% mutant	≥ 5 % mutant	1-10 % mutant
Assay	G12C	1%	1%
	G12X	1%	≤ 5%
	G13D	1%	2%
	G13C	1%	N/A
	A59X	1%	≥ 5 % mutant
	Q61X	2%	1%
	K117X	1%	10%
	A146X	5%	2%
Interpretation	Manual	Auto	Auto/Manual
Cost per sample	4,791.6 baht	4,146.25 baht	3,250 baht