Innovation

การเตรียมความพร้อมการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคโควิด-19 โดยประยุกต์ใช้ชุดตรวจแบบรวดเร็วชนิด LAMP

ประจวบ ชัยมณี[1], พิมใจ อนันตา[1], สุปราณี พันธุ์ธนวิบูลย์[2]
[1]หน่วยชีวโมเลกุลวินิจฉัย งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้รับผิดชอบบทความ : ประจวบ ชัยมณี
หน่วยชีวโมเลกุลวินิจฉัย งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
Email: pracha4@kku.ac.th
0-4336-6612, 0-4336-6976

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: การตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องแม่นยำรวดเร็วและมีราคาที่เข้าถึงได้ มีความสำคัญจำเป็นในการจัดการกับโรคติดเชื้อโดยเฉพาะโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ เช่น โรคโควิด-19 ที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของทุกประเทศทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย Loop mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยแบบรวดเร็วที่ได้รับความนิยมเนื่องจากทำได้ง่ายและมีความแม่นยำ หน่วยชีวโมเลกุลวินิจฉัย งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ได้มีการดำเนินการเพื่อพัฒนาห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 จนสามารถผ่านมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และได้รับประกาศเป็นห้องปฏิบัติการเครือข่ายตรวจ SARS-CoV-2 ได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค Loop mediated isothermal amplification เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (real-time RT-PCR) เพื่อใช้ในการเตรียมทางเลือกสำหรับรับมือการตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19

วิธีการศึกษา: ประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP โดยสังเคราะห์ RNA เป้าหมายเพื่อทดลองหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมและหา LOD นำชุดตรวจ LAMP ที่ได้ไปทดสอบกับ clinical samples ของโรงพยาบาลเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

ผลการศึกษา: พบว่า primer ที่เลือกใช้ในการทำปฏิกิริยา LAMP เพื่อทดสอบ SARS-COV-2 มีความไวโดยผลบวกกับ N gene viral RNA synthesis ได้ไปถึง 200 RNA copies number และเมื่อนำมาตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ในการเกิดปฏิกิริยาพบว่า primer LAMP ที่เลือกใช้ให้ผลบวกกับ SARS-COV-2 ได้อย่างจำเพาะ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อในกลุ่ม respiratory tract infection อื่นๆ ได้แก่ Influenza, Parainfluenza, RSV และเชื้อในกลุ่ม common coronavirus อื่นๆ รวมถึงเชื้อที่ทำให้เกิดไข้ไม่ทราบสาเหตุ เช่น ไวรัสเดงกี่ ชิคุนกุนยา หรือ ซิกา เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน real-time RT-PCR พบว่าวิธี LAMP ให้ผลสอดคล้องในแนวทางเดียวกันกับวิธีมาตรฐาน

สรุป: การประยุกต์ใช้ LAMP เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ Covid-19 ในงานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์มีความเป็นไปได้ เนื่องจากมีความสามารถในการตรวจได้อย่างจำเพาะ และตรวจได้ผลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามเนื่องจากปริมาณของตัวอย่างส่งตรวจยังมีไม่มากจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: Covid-19, Rapid detection, LAMP

ความสำคัญและที่มาของโครงการ

ไวรัสโคโรนา (Coronavirus; CoV) เป็นไวรัสสำคัญที่มีความสามารถในการก่อโรคในคนและสัตว์ได้ในหลายระบบ เชื้อในกลุ่ม coronavirus ที่ก่อโรคในคนมี 7 ชนิด แบ่งเป็น common coronavirus 4 ชนิด ได้แก่สายพันธุ์ 229E, NL63, OC43 และ HKU1 (https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html) และเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอุบัติใหม่ที่รุนแรง ได้แก่ Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV; China, 2003) และ Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV; Saudi Arabia, 2012) ซึ่งก่อโรคที่รุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตสูง ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (Novel coronavirus 2019; COVID-19; SARS-CoV2)[1] เป็นไวรัสที่ก่อโรคในคนชนิดใหม่ที่เกิดขึ้นแม้ว่าความรุนแรงและอัตราการเสียชีวิตของการติดเชื้อ COVID-19 ที่พบในปัจจุบันยังไม่สูงเท่า SARS-CoV และ MERS-CoV แต่มีอัตราการแพร่กระจายเชื้อไวรัสที่ค่อนข้างสูง ซึ่งสถาณการณ์ ณ วันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2563 เวลา 16.30 น. พบผู้ติดเชื้อ 17,393 ราย ในพื้นที่ 27 ประเทศทั่วโลก มีรายงานผู้เสียชีวิต 362 ราย ส่วนประเทศไทยพบผู้ป่วยที่มีผลการตรวจยืนยัน (confirmed case) 19 ราย (https://thewuhanvirus.com/) และยังมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง ซึ่งยังไม่มียาจำเพาะที่ใช้ในการรักษาและวัคซีนที่ใช้ป้องกันการติดเชื้อไวรัส[2] ดังนั้น การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเพื่อคัดกรองผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาที่มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคซึ่งเกิดขึ้นใหม่นี้ การตรวจพบผู้ป่วยในระยะ

เบื้องต้นจะช่วยให้เกิดการจัดการและการรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงทีเพื่อลดการระบาดและอัตราการเสียชีวิต

การตรวจวินิจฉัยที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการมาตรฐานเพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ COVID-19 คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR (rRT- PCR) ใช้เวลาตั้งแต่เก็บตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์จนทราบผลประมาณ 3-5 ชั่วโมง หากผลการตรวจเป็นบวกจะดำเนินการตรวจยืนยันอีกครั้งด้วยการตรวจลำดับนิวคลิโอไทด์ (Nucleotide sequencing)ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องใช้ความเชี่ยวชาญ ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง[10] โดยปัจจุบันหน่วยชีวโมเลกุลวินิจฉัย งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ได้ผ่านมาตรฐานการตรวจ Covid-19 จากกรมวิทย์ให้เป็นห้องปฏิบัติการเครือข่ายตรวจ SARS-CoV-2 โดยใช้ real-time RT-PCR (Allplex™ 2019-nCoV Assay)จากบริษัท Seegene ประเทศเกาหลีใต้ โดยมีความไวที่ 100 RNA copies/reaction (http://www.seegene.com)

การประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP (loop mediated isothermal amplification) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนที่คิดค้นโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่น[3] เป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้ครอบคลุมความต้องการข้างต้น รวมถึงสามารถพัฒนาไปใช้ในภาคสนามได้เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้โดยง่ายและใช้เครื่องมือไม่ซับซ้อน เป็นที่นิยมใช้โดยหลักการการใช้อุณหภูมิเดียวทำให้ลดความยุ่งยากซับซ้อนในการใช้เครื่องมือทำให้เหมาะกับห้องปฏิบัติการและการใช้ออกภาคสนาม สามารถตรวจได้ทั้งจาก DNA และ RNA เป็นตัวตั้งต้น และมีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาเชื้ออื่น ๆ เช่น Influenza virus, Zika virus[4,5] รวมถึงการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Covid-19 ด้วย

งานวิจัยนี้มีความสนใจที่นำเทคนิค LAMP (loop mediated isothermal amplification) ที่ได้มีการประยุกต์และปรับปรุงมาจากการศึกษาก่อนหน้า[6] ที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้ 5 คู่ จำเพาะต่อ N gene และ ORF gene ซึ่งจากการศึกษาได้ใช้ตัวอย่างส่งตรวจจากผู้ป่วยในประเทศจีนจำนวน 6 ตัวอย่างซึ่งแต่ละไพรเมอร์ให้ผลได้ไม่เท่ากัน โดยไพรเมอร์ NA และ ORF A ได้ถูกสรุปว่าให้ผลดีที่สุดในการศึกษาและให้ผลสอดคล้องกับผล real-time RT-PCR อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวนนี้เหมาะสมกับตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยจากประเทศไทยหรือไม่ โดยวิธี LAMP เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว เพราะสามารถเริ่มจากการใช้ RNA ที่ได้จากตัวอย่างส่งตรวจ และใช้อุณหภูมิเดียวในการทำปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาไม่เกิน 30 นาทีในการอ่านผล ซึ่งสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธี real-time RT-PCR อย่างมาก โดยงานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อจะตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำและความรวดเร็วของการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP เพื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค real-time RT-PCR ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการ โดยได้มีการปรับปรุงวิธีการโดยการเพิ่มปริมาณ primer ให้เหมาะสมและลดเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจ โดยให้มีการจับกับยีน N ของเชื้อเป้าหมาย ซึ่งเทคนิคนี้จะช่วยย่นระยะเวลา ขั้น

ตอน และน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย และสามารถมองเห็นผลได้ด้วยตาเปล่า ผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหวังว่าจะสามารถนำเทคโนโลยีที่มีอยู่มาพัฒนาต่อเพื่อใช้ผลิตชุดตรวจชนิด rapid LAMP ที่มีความแม่นยำและความไวสูง สามารถตรวจได้ในระยะเวลาอันสั้น และมีขั้นตอนที่ง่ายกว่าเดิม สามารถนำไปใช้ในจุดคัดกรองผู้ป่วยที่มีการเดินทางเข้า-ออกจำนวนมาก ในโรงพยาบาลหรือในช่วงที่มีการระบาด

วัตถุประสงค์

1. ประยุกต์ใช้ระบบ LAMP detection ในการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่
2. เปรียบเทียบความไวและความจำเพาะในการใช้ LAMP ในการตรวจเทียบกับ rRT-PCR

วิธีการศึกษา

การดีไซน์และเลือก primer สำหรับ LAMP และ N gene

ในการศึกษาก่อนหน้า[6] ได้มีการออกแบบ primer จำนวน 5 คู่ ที่จำเพาะต่อยีน 2 ชนิดคือ N gene และ ORF gene ซึ่งนักวิจัยได้ทำการเลือก NA เพื่อใช้เป็นเป้าหมายในการประยุกต์ใช้ เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมมีความจำเพาะต่อตัวเชื้อในกลุ่มเดียวกันและต่างจากกลุ่มอื่น และได้มีการโคลน N gene เป้าหมายซึ่งมีขนาด 419 amino acid ซึ่ง primer ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ดังตารางที่ 1

ตารางที่1 ไพรเมอร์สำหรับ N gene synthesis และ ไพรเมอร์สำหรับ LAMP[6]

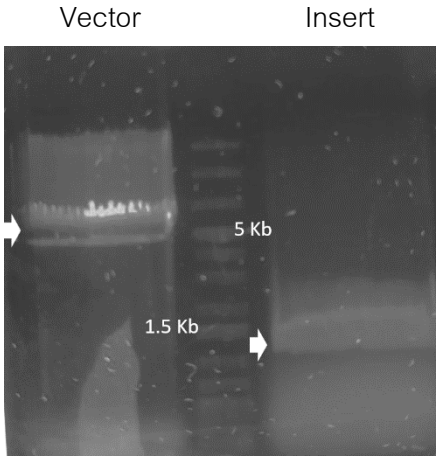
Primer	Base	Ref.
N gene synthesis1	GGCGGATCCGGATGTCTGATAATGGACCCCAAA	Supranee
N gene synthesis2	TGCTGACTCAACTCAGGCCTAAGCGGCCGCCCG	Supranee
GeneN-A-F3	TGGCTACTACCGAAGAGCT	Zhang
GeneN-A-B3	TGCAGCATTGTTAGCAGGAT	Zhang
GeneN-A-FIP	TCTGGCCCAGTTCCTAGGTAGTCCAGACGAATTCGTGGTGG	Zhang
GeneN-A-BIP	AGACGGCATCATATGGGTTGCACGGGTGCCAATGTGATCT	Zhang
GeneN-A-LF	GGACTGAGATCTTTCATTTTACCGT	Zhang
GeneN-A-LB	ACTGAGGGAGCCTTGAATACA	Zhang

การทำ Covid-19 N gene RNA synthesis

เมื่อเลือกเป้าหมาย N gene จึงทำการสร้าง plasmid ที่มี N gene ของ Covid-19 โดยใช้เทคนิคการโคลนนิ่ง โดยเริ่มจากคัดเลือก vector ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสาย RNA ได้ โดยในการศึกษานี้เลือกใช้ pCDNA6 ที่มี T7 promoter และทำการสร้างสาย cDNA จาก RNA ของเชื้อ Covid-19 ที่ถูกทำให้หมดสภาพการติดเชื้อแล้ว สาย cDNA ถูกนำมาเป็นต้นแบบในการผลิต N gene PCR product ขนาด 1257 base pair (419 amino acid) โดย PCR product จะมีปลายของ restriction enzyme ที่ดีไซน์ไว้ใน primer ที่ใช้สำหรับ amplification หลังจากนั้นจะทำการตัด PCR product และ เวคเตอร์ด้วย *Bam* HI และ *Not* I ก่อนที่จะทำให้บริสุทธิ์โดยการนำมาแยกขนาดใน gel electrophoresis โดยขนาดของ vector 5.1 Kb และ PCR product ประมาณ 1250 base pair เทียบกับ 1 Kb DNA marker (Accuris, USA) ดังรูปที่ 1 เมื่อตัดเอาแบนที่ต้องการเพื่อสกัดเอา vector และ PCR product ออกมาเพื่อทำการเชื่อมต่อกันโดยใช้ T4 DNA ligase หลังจากนั้นทำการ transform เข้าสู่ *E.coli* และทำการคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องโดยการตัดเพื่อคัดเลือกก่อนนำไปเป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์ RNA

การทำปฏิกิริยา LAMP และการทดสอบหา Limit of detection

เมื่อได้ RNA ของ N gene ได้นำมาปรับความเข้มข้นให้เป็น 1 ug/ul ซึ่งเมื่อคำนวณค่าให้เป็น RNA copy number แล้วเท่ากับ 10^{12} RNA copy number หลังจากนั้นทำการลดปริมาณ ให้เป็น 10^{9}, 10^{6}, 10^{3}, 10^{2} และ 10^{1} เพื่อนำมาทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 2X master mix WarmStart Colorimetric Lamp, 20 uM ของ Forward Inner Primer (FIP), Backward Inner Primer (BIP), F3 และ B3 primers และ 40 µM ของ Forward Loop (LF) และ Backward Loop (LB) หลังจากนั้นเติม RNA 2 ul และเติมน้ำกลั่นให้ถึง 10 ul หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาดูผล



รูปที่ 1 gel electrophoresis โดยขนาดของ vector ด้านซ้ายของ DNA marker ขนาด 5.1 Kb และ PCR product ด้านขวาของ DNA marker ประมาณ 1250 base pair เทียบกับ 1 Kb DNA marker (ปกหน้า)

การเตรียมส่วนประกอบ LAMP reaction

ตารางที่ 2 สารและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP

Reaction mixture	ปริมาณ (ul)
2X Master mix	5
FIP	0.2
BIP	0.2
F3	0.2
B3	0.2
LF	0.4
LB	0.4
RNA	2
Dw	1.4

การเตรียมตัวอย่าง RNA ของไวรัสจากห้องปฏิบัติการและการเตรียม RNA จากตัวอย่างส่งตรวจเพื่อทดสอบความจำเพาะของ LAMP กับไวรัส Covid-19 และไวรัสอื่น ๆ

หน่วยชีวโมเลกุลวินิจฉัย งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ได้มีการตรวจไวรัสที่ก่อโรค Covid-19 และ respiratory tract virus วิธี Real-time PCR โดยมีวิธีการเตรียม RNA จากตัวอย่างส่งตรวจผู้ป่วย โดยใช้เครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ magLEAD12gc (บริษัท PSS, ประเทศญี่ปุ่น) โดยคร่าว ตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วย (nasopharyngeal swab in UTM) เมื่อส่งถึงห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร จะมีการเตรียมโดยเติม internal control 10 uL ในตัวอย่าง 400 uLก่อนจะนำเข้าเครื่อง magLEAD12gc และใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม MagDEA DxSV (PSS) เมื่อเริ่มการทำงานจะใช้เวลา 30 นาที และ ได้ปริมาณสารพันธุกรรม 50 uL (total nucleic acid) จนเสร็จสิ้นกระบวนการ ก่อนนำไปตรวจด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการและเก็บส่วนที่เหลือไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

RNA ที่สกัดได้จะถูกนำไปตรวจหาเชื้อ Covid-19; SARS-nCoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR โดย Allplex 2019-nCoV Assay (Seegene; REF. RP102443X) และเชื้อก่อโรคใน respiratory tract ด้วยวิธี real-time RT-PCR โดย Allplex Respiratory pathogens (Seegene) ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจได้ 19 สายพันธุ์ และแบคทีเรียก่อโรคทางเดินหายใจได้ 7 สายพันธุ์[8] การเตรียมส่วนประกอบ master mix ของชุดน้ำยาตรวจ Covid-19 และเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ (2019-nCoV MOM, RP1 – RP4) ดังตารางที่ 3 และ การทำปฏิกิริยาตรวจสอบด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของ master mix สำหรับตรวจหาเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจ (Allplex 2019-nCoV Assay และ Allplex Respiratory assays)

ส่วนประกอบ (Mastermix)	ปริมาตรของสาร (µL/ reaction)
5X 2019-nCoV MOM or P1-RP4	5
RNase-free water	5
5x Real-time One-step Buffer	5
Real-time One-step Enzyme	2
RNA sample	8
Total	25

ตารางที่ 4 ปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและการตรวจวัดหาเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจ Covid-19 (Allplex 2019-nCoV Assay)

Procedure	Temp (°C)	Time	Repeat
RT step	50	20 min	
Pre-Denature	95	15 min	
Denature	94	15 sec	44 cycles
Anneal (Plate read at these step)	58	30 sec	
Keep cool	4		

ตารางที่ 5 ปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและการตรวจวัดหาเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจ (Allplex Respiratory assays)

Procedure	Temp (°C)	Time	Repeat
RT step	50	20 min	
Pre-Denature	95	15 min	
Denature	95	10 sec	44 cycles
Anneal (Plate read at these step)	60	60 sec	
Extension (Plate read at these step)	72	10 sec	

ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นการทำ Real-time RT-PCR แล้ว จะทำการ export เข้าโปรแกรมการอ่านผลอัตโนมัติ (Seegene viewer; Seegene) โดยการศึกษานี้ได้คัดเลือก RNA ของตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลบวกกับไวรัส Covid-19, influenza, parainfluenza, RSV และเชื้อในกลุ่ม common coronavirus

นอกจากนั้นตัวอย่าง RNA ที่สกัดจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา เดงกี่ ชิคุนกุนยา และซิกา ได้ถูกนำมาทดสอบกับเทคนิค LAMP โดย RNA ของเชื้อจากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา ถูกสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไวรัสเดงกี่ ชิคุนกุนยา หรือ ซิกา ปริมาณ 10^5 copy/ml โดยใช้ QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA) ตามวิธีทำของบริษัท โดยคร่าวคือ เติม AVL (with carrier RNA) 560 µL ลงในหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไวรัส 140 µL ผสมให้เข้ากัน แบบ pulse vortex mixing นาน 15 วินาที แล้ว spin down และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติม Absolute ethanol 560 µL ผสมแบบ pulse vortex mixing นาน 15 วินาที แล้ว transfer solution ไปใส่ใน column tube ปริมาตรประมาณ 700 µL ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน collection tube แล้วเติม mixture

solution ที่เหลือทั้งหมดลงใน column tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิมซ้ำอีกรอบ แล้วเปลี่ยน collection tube ใหม่เ ติม AW1 washing buffer 500 µL ลงไปใน column tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เติม AW2 washing buffer 500 µL ลงไปใน column tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้น Dry column และเติม AVE buffer ปริมาตร 60 µL ลงไปใน column โดยวาง tip ลงตรงกลางของ column tube จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บ RNA ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm 1 นาที และเก็บ RNA ที่ -80 องศาเซลเซียสก่อนจะใช้งาน โดย viral RNA จากห้องปฏิบัติการได้ถูกตรวจสอบยืนยันผลแล้วด้วยเทคนิค real-time RT-PCR โดยใช้ primer D1-Fw และ D2-Rv primer[10]

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของ SYBrGreen mixture สำหรับตรวจหา DENV ด้วยไพรเมอร์ D1 และ D2 ที่ให้ขนาด 511 bp

ส่วนประกอบ (Mastermix)	ปริมาตรของสาร (µL/ reaction)
SYBR green	5
10 µM D1-Fw primer	0.25
10 µM D2-Rv primer	0.25
DW	2.5
cDNA	2
Total	10

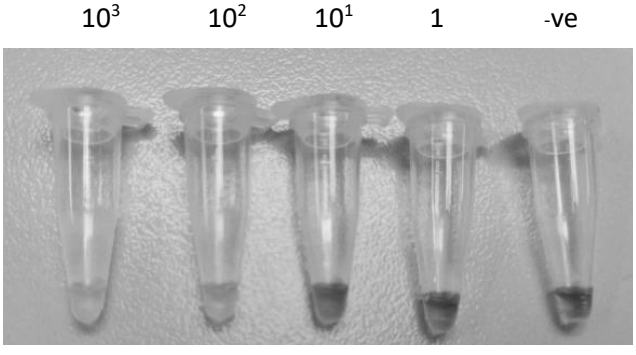
ตารางที่ 7 Real-time PCR conditionสำหรับตรวจหา DENV ด้วยไพรเมอร์ D1 และ D2 ที่ให้ขนาด 511 bp

Procedure	Temp (°C)	Time
Pre-Denature	95	2 min
Denature	95	15 sec
Anneal	55	30 sec
Extension	72	45 sec

ผลการศึกษา

Limit of detection ของ LAMP N gene

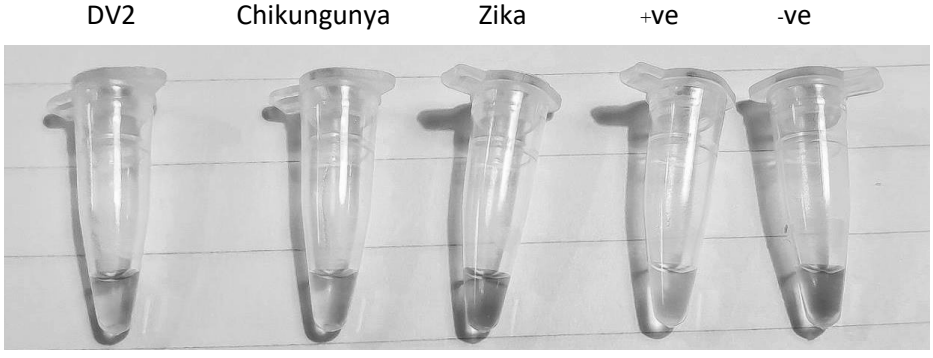
ผลการศึกษา LAMP กับ RNA สังเคราะห์ของ N gene เมื่อได้ RNA ของ N gene ได้นำมาปรับความเข้มข้นให้เป็น 1 ug/uL ซึ่งเมื่อคำนวณค่าให้เป็น RNA copy number แล้วเท่ากับ 10^{12} RNA copy number หลังจากนั้นทำการลดปริมาณ ให้เป็น 10^3, 10^2, 10 และ 1 RNA copy number เพื่อนำมาทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาให้ผลบวกคือสีเหลือง กับ RNA สังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นที่ลดปริมาณลงได้ถึง 100 RNA copy number และไม่เกิดปฏิกิริยา หรือที่เห็นเป็นสีแดงกับความเข้มข้นตั้งแต่ 10 RNA copy number และ negative control ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 Limit of detection ของ LAMP N gene กับ RNA N gene ที่สังเคราะห์ขึ้น ขนาด 10^3, 10^2, 10 และ 1 RNA copy number เทียบกับ negative control (-ve) (ปกหน้า)

ความจำเพาะเมื่อทดสอบกับไวรัสที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

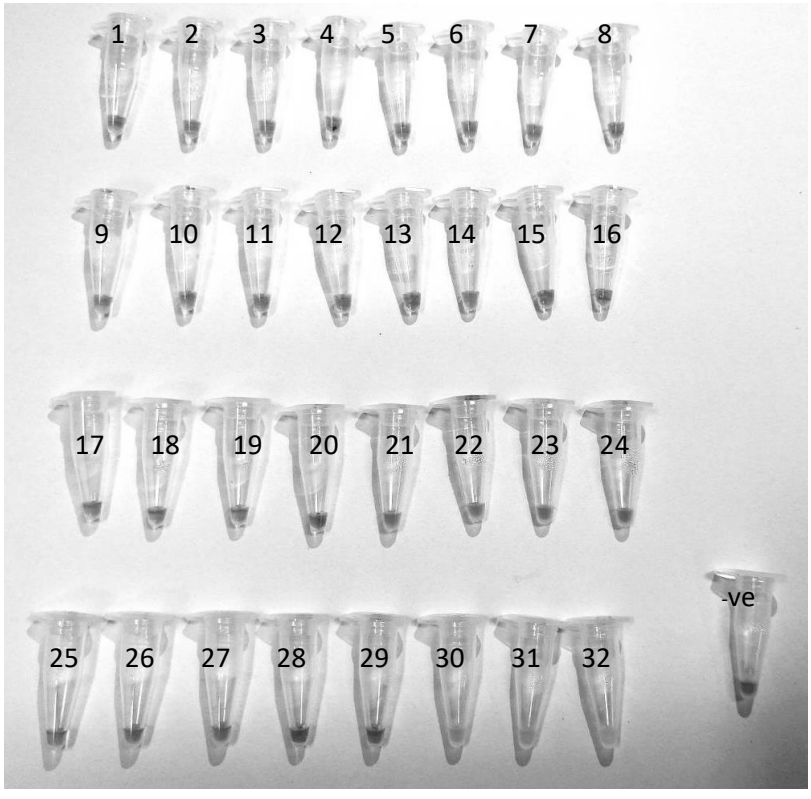
ความจำเพาะของ LAMP N gene ถูกทดสอบใน 2 กลุ่มเชื้อได้แก่กลุ่มเชื้อในห้องปฏิบัติการ และกลุ่มเชื้อจากตัวอย่างส่งตรวจ สำหรับ กลุ่มเชื้อก่อโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุอื่น ๆได้แก่ ไวรัสเดงกี่ ชิคุนกุนยา และซิกา ที่เป็นเชื้อที่ถูกเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ RNA ที่สกัดมาจากเชื้อปริมาณ 10^5 FFU/mL ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น ซึ่งพบว่า LAMP N gene ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อดังกล่าว ทำให้ยังคงเป็นสีแดงอยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับ N gene RNA synthesis positive control ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP N gene กับเชื้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เดงกี่ซีโรไทป์ 2 (DV2), ชิคุนกุนยา (Chikungunya), ซิกา (Zika), คอนโทรลผลบวก (+ve, N gene RNA) และ คอนโทรลผลลบ (-ve) (ปกหน้า)

การเปรียบเทียบผลการทดสอบ LAMP กับตัวอย่างส่งตรวจจริงที่ตรวจสอบด้วย real-time RT-PCR

ความจำเพาะของ LAMP N gene ที่ถูกทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างจากผู้ป่วยจริงซึ่งได้รับการตรวจยืนยันผลจากทางงานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตรแล้วว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่ติดต่อทางทางเดินหายใจได้แก่ influenza, parainfluenza, Rhinovirus, Adenovirus, human Bocavirus, RSV และเป็นกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่ได้มีการติดเชื้อ โดย RNA ที่ทราบผลตรวจที่เหลือจากการตรวจสอบจากห้องปฏิบัติการจะถูกนำมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้ดังตารางที่ 5 และให้ผลดังรูปที่ 4 โดยจากผลการทดสอบความจำเพาะของ LAMP กับไวรัสในสิ่งส่งตรวจไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม โดยให้ผลบวกสีเหลืองกับเฉพาะตัวอย่างที่เป็นเชื้อ Covid-19 ทั้งตัวอย่างที่เป็นสิ่งส่งตรวจควบคุมจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วย Covid-19 ที่เข้ารับการตรวจในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ และให้ผลบวกกับ N gene RNA synthesis เท่านั้น สำหรับผลของปฏิกิริยา LAMP กับตัวอย่างส่งตรวจที่เป็นเชื้อในระบบทางเดินหายใจตัวอื่น ๆ และเชื้อกลุ่ม common coronavirus พบว่าให้ผลลบสีแดง



รูปที่ 4 ผลปฏิกิริยา LAMP กับ ตัวอย่าง RNA ที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการ 1: hMPV, 2: FluAH1N12009, 3: FluAH1N12009 and Adenovirus, 4: Corona229E, 5: FluAH1N12009, 6: Adenovirus and Rhinovirus, 7: Adenovirus, Enterovirus and Rhinovirus, 8: Metapneumovirus, 9: Metapneumovirus, Enterovirus and Rhinovirus, 10: Parainfluenza virus type 4, 11: Rhinovirus, 12: Parainfluenza virus type 1, 13: *H. influenza*, 14: *H. influenza*, 15: Adenovirus, Enterovirus, Rhinovirus and Bocavirus, 16: *H. influenza*, 17: *H. influenza*, 18: Adenovirus and *S. pncumoniae*, 19: Coronavirus OC43 and *S. pncumoniae*, 20: Parainfluenza virus type3, *H. influenza* and *S. pneumoniae*, 21: Parainfluenza virus type 3, Bocavirus, Enterovirus, Rhinovirus and *H. influenza*, 22: Parainfluenza type 1, 23: Human bocavirus, 24: Adenovirus, Rhinovirus, *S. pneumoniae* and *H. influenza*, 25: Dengue virus type 2, 26: Chikungunya virus, 27: Zika virus, 28: Chikungunya virus, 29: negative sample, 30-31: SARS-CoV-2 positive sample 32: positive control, -ve: negative control (DW) (ปกหน้า)

สรุปและอภิปราย

วิธีการตรวจเชื้อ Covid-19 ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็วและมีราคาไม่สูง เพื่อลดภาระค่าใช้จ่ายของภาครัฐและประชาชน ยังคงเป็นที่ต้องการในการพัฒนาและศึกษาเพื่อนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล เนื่องจากในระบบบริการสุขภาพของภาครัฐ สามารถเบิกจ่ายได้ในกรณีที่มีอาการของโรคหรืออยู่ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงตามที่กำหนดเท่านั้น การประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP (loop mediated isothermal amplification) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้ครอบคลุมความต้องการข้างต้น ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคนี้โดยนักวิจัยหลายกลุ่ม โดยเป้าหมายส่วนมากจะเป็น N gene ของไวรัสซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับไวรัสในกลุ่มนี้ จากการทดสอบครั้งนี้โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ N gene พบว่ามีความสามารถในการตรวจจับ N gene RNA ที่สังเคราะห์ขึ้นได้ และสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยกับตัวอย่าง RNA จากตัวอย่างส่งตรวจจริงจากผู้ป่วยติดเชื้อ Covid-19 และตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวควบคุมชนิดบวกจากการประกันคุณภาพจากองค์กรภายนอก (EQA; external quality assurance) โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามหรือ false positive กับแบคทีเรียหรือไวรัสตัวอื่น ๆ ที่เป็นเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจ (รูปที่ 4) และไวรัสกลุ่มที่ก่อให้เกิดไข้ไม่ทราบสาเหตุที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 3) ดังนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพิจารณานำมาใช้ในการตรวจเชื้อก่อโรค Covid-19 ในโรงพยาบาล เนื่องจากมีราคาต่ำกว่าเทคนิค real-time RT-PCR ที่ใช้กันอยู่ ใช้เวลาในการตรวจไม่นาน ประมาณ 30 นาที และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง กล่าวคือสามารถใช้ water bath ที่ 65 องศาเซลเซียส ก็สามารถทำการตรวจวัดได้ หรือสามารถนำไปใช้กับเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ที่มีอยู่แล้วได้ และสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเหมาะกับการตรวจในกรณีที่ต้องการเวลาที่รวดเร็ว มีงบประมาณจำกัดและมีปริมาณตัวอย่างที่ต้องการตรวจปริมาณมาก

อย่างไรก็ตามการจะนำวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยในงานประจำจำเป็นต้องมีการทวนสอบผลการตรวจกับตัวอย่างจริงในจำนวนที่มากพอ เพื่อให้สอดคล้องกับข้อกำหนดตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Peng Wu, Xinxin Hao, Eric H Y Lau, Jessica Y Wong, Kathy S M Leung, Joseph T Wu, et al., Real-time tentative assessment of the epidemiological characteristics of novel coronavirus infections in Wuhan, China, as at 22 January 2020. **Euro Surveill** 2020; 25:2000044. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000044.
2. Lu H. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). **Biosci Trends** 2020; 14:69-71. doi: 10.5582/bst.2020.01020.

3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic Acids Res 2000; 28; e63.
4. Su Jeong Ahn, Yun Hee Baek, Khristine Kaith S Lloren, Won-Suk Choi, Ju Hwan Jeong, Khristine Joy C Antigua, et al. Rapid and simple colorimetric detection of multiple influenza viruses infecting humans using a reverse transcriptional loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. BMC Infect Dis 2019;19: 676. doi.org/10.1186/s12879-019-4277-8
5. Kattika Kaarj, Patarajarin Akarapipad, Jeong-Yeol Yoon. Simpler, Faster, and Sensitive Zika Virus Assay Using Smartphone Detection of Loop-mediated Isothermal Amplification on Paper Microfluidic Chips. Scientific Report 2018; 8:12438, DOI:10.1038/s41598-018-30797-9.
6. Yinhua Zhang, Nelson Odiwuor, Jin Xiong, Luo Sun, Raphael Ohuru Nyaruaba, Hongping Wei, et al. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2(COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. medRxiv (2020) DOI: https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028373
7. Stien Vandendriessche, Elizaveta Padalko, Elke Wollants, Charlotte Verfaillie, Bruno Verhasselt, Liselotte Coorevits. Evaluation of the Seegene Allplex™ Respiratory Panel for diagnosis of acute respiratory tract infections. Acta Clinica Belgica 2019; 74: 379-85.
8. Barratt, et al. (2017) Comparison of the fast track diagnostics respiratory 21 and Seegene Allplex multiplex polymerase chain reaction assays for the detection of respiratory viruses, Br J of Biomed Sci 2017;74: 85-9, DOI:10.1080/09674845.2017.1278885
9. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 545-51.
10. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทางห้องปฏิบัติการ. 2020.