ว กรมวิทย พ 2563; 62 (3) : 143-154

การพัฒนาชุดน้ำยา DMSc COVID-19 real-time RT-PCR

พิไลลักษณ์ อัคคไพบูลย์ โอกาดะ[1] วราวรรณ วงษ์บุตร[1] ธนัสภา ธนเดชากุล[1] สิริภาภรณ์ ผุยกัน[1] สิริชล กาละ[1] วันดี มีฉลาด[1] สุนทรียา วัยเจริญ[1] มาลินี จิตตกานต์พิชย์[2] และบัลลังก์ อุปพงษ์[1]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข [2]สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคโควิด-19 มีความสำคัญสำหรับการตรวจคัดกรองและยืนยันการติดเชื้อในผู้ป่วย ผู้สัมผัส และกลุ่มเสี่ยง เพื่อให้ผู้ติดเชื้อได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมและทันท่วงที จึงได้พัฒนาชุดน้ำยา DMSc COVID-19 real-time RT-PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโควิด-19 โดยตรวจยีนเป้าหมาย RdRp และ N ร่วมกับการประเมินวิธีการเตรียมสารพันธุกรรม RNA โดยวิธีให้ความร้อน และโดยน้ำยาย่อยสลายเซลล์ และประเมินน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพในปฏิกิริยา real-time RT-PCR จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Tween 20 (0.5%) Glycerol (10, 15, 20%) Dimethyl sulfoxide (10%) Bovine serum albumin (10 mg/mL) และ Triton X-100 (0.1%) พบว่าความไวในการตรวจหายีน RdRp และยีน N ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 50 และ 5 copies ต่อ reaction ตามลำดับ การเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรมด้วยวิธี heat และ direct lysis มีความไวร้อยละ 97.14 และ 100 และความจำเพาะร้อยละ 95.89 และ 94.52 ตามลำดับ และพบว่าน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพซึ่งประกอบด้วย Tween 20 (0.5%) และ Glycerol (15%) มีความไวและความจำเพาะในการตรวจยีนเป้าหมายร้อยละ 100 แสดงว่าชุดน้ำยา DMSc COVID-19 real-time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ร่วมกับการเตรียมตัวอย่างโดยตรงโดยไม่ผ่านกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมได้ ทำให้ช่วยลดต้นทุนการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและมีความรวดเร็วยิ่งขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมและตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 ได้

คำสำคัญ: โรคโควิด-19, เชื้อ SARS-CoV-2, เรียลไทม์ อาร์ที พีซีอาร์

Corresponding author E- mail: pilailuk.o@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020 *Revised: 5 September 2020* *Accepted: 13 September 2020*

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือโรคโควิด-19 (Coronavirus Disease 2019 หรือ COVID-19) เป็นโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ถือเป็นโรคอุบัติใหม่ที่ทำให้เกิดการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) รวมถึงประเทศไทย จากรายงานสถิติผู้ติดเชื้อประจำวันโดยองค์การอนามัยโลก ณ วันที่ 14 มิถุนายน 2563 พบมียอดผู้ป่วยติดเชื้อสะสม 7,690,708 ราย และเสียชีวิต 427,630 ราย ขณะที่ในประเทศไทยพบผู้ป่วยติดเชื้อสะสมจำนวน 3,135 ราย และเสียชีวิต 58 ราย[1]

เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 มีขนาด 60-140 นาโนเมตร หุ้มด้วยชั้นไขมัน มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว แบบสายบวก (positive single-stranded RNA) ขนาดยีโนม 27-32 กิโลเบส (kb) ประกอบด้วยยีน Orf (open reading frame; Orf1a, Orf1ab), RdRp (RNA-dependent RNA polymerase gene), S (spike protein gene), E (envelope protein gene), M (membrane protein gene), N (nucleocapsid protein gene)[2] จัดอยู่ในยีนัสเบต้าโคโรนาไวรัส (Betacoronavirus) ซึ่งเป็นยีนัสเดียวกับเชื้อ Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) และเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (Middle East Respiratory Syndrome หรือ MERS-CoV) ที่ก่อโรคระบบทางเดินหายใจ สามารถแพร่กระจายผ่านละอองฝอยของสารคัดหลั่งระบบทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อในอุจจาระและพบปนเปื้อนจากมือผู้ป่วยทำให้มีโอกาสแพร่เชื้อไปยังบุคคลอื่นได้[3, 4]

การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคอุบัติใหม่เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองและยืนยันการติดเชื้อในผู้ป่วย ผู้สัมผัส หรือกลุ่มเสี่ยง มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่เหมาะสมและทันท่วงที องค์การอนามัยโลก ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของสหรัฐอเมริกา ห้องปฏิบัติการอ้างอิงในประเทศไทยและประเทศต่าง ๆ ได้มีการพัฒนาเทคนิค real-time reverse transcription-PCR (real-time RT-PCR) ซึ่งปัจจุบันถือเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย เช่น ป้ายคอ (throat swab) ร่วมกับป้ายโพรงจมูก (nasopharyngeal swab) เสมหะ (sputum) ตัวอย่างอื่น ๆ ที่เก็บจากระบบทางเดินหายใจ หรือจากตัวอย่างอุจจาระ[2, 5, 6] สำหรับประเทศไทย ถือว่าเป็นประเทศลำดับต้น ๆ ที่ตรวจยืนยันผู้ป่วยติดเชื้อก่อโรคโควิด-19 นอกประเทศจีน โดยการถอดรหัสสารพันธุกรรมทั้งยีโนมของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างผู้ป่วย 2 รายแรกด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing [7] จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสที่พบในผู้ป่วยข้างต้นนำมาสู่การออกแบบชุดไพรเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 สำหรับพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโควิด-19 ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว น่าเชื่อถือ มีความไวและความจำเพาะสูง [8] โดยคัดเลือกยีนจำเพาะต่อเชื้อจำนวน 2 ยีน ได้แก่ ยีน N และยีน RdRp ในการตรวจวินิจฉัยนี้ได้มีการออกแบบการตรวจหายีน RdRp ร่วมกับยีน RNase P ของคน ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control)[9] ในคราวเดียวกัน จึงสามารถตรวจหาชนิดของยีนเป้าหมายหลายชนิดไปพร้อมกัน ทำให้ประหยัดเวลาและต้นทุนในตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจระบบทางเดินหายใจโดยตรง ในการตรวจวินิจฉัยสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์อย่างมีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องมีการตรวจติดตามตัวควบคุมภายในซึ่งเป็นยีนของคนร่วมด้วย โดยยีนที่องค์การอนามัยโลกใช้สำหรับตรวจหาเชื้อก่อโรคไข้หวัดใหญ่จากสิ่งส่งตรวจของคน คือ ยีน RNase P ยีนนี้สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ การเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมควรตรวจพบยีน RNase P ร่วมด้วย กรณีที่ตรวจไม่พบยีน RNase P ในตัวอย่างอาจชี้ให้เห็นว่า 1) วิธีการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจไม่เหมาะสมทำให้สูญเสีย RNA หรือ RNA ถูกทำลาย 2) การเก็บตัวอย่างไม่เหมาะสม 3) การเตรียมน้ำยาสำหรับตรวจวินิจฉัยไม่เหมาะสม และ 4) น้ำยาหรือเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยไม่เหมาะสมหรืออาจมีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้เป็นต้น[6, 9]

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีประสิทธิภาพ นอกจากต้องมีความรวดเร็ว น่าเชื่อถือ มีความไวและความจำเพาะสูงแล้ว ควรมีกระบวนการที่ปฏิบัติได้ง่าย สะดวก และต้นทุนต่ำ เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในกรณีที่เกิด

การระบาดของโรคในวงกว้าง การเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อเป้าหมายเป็นขั้นตอนขั้นต้นของการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา โดยการเตรียมสารพันธุกรรมที่เหมาะสมมีผลต่อความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์ วิธีการสกัดสารพันธุกรรม RNA จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป ซึ่งมีขั้นตอนสำคัญ คือ การทำลายโปรตีนและเอ็นไซม์ RNase ไม่ให้ย่อยสลาย RNA เป้าหมาย[10] อย่างไรก็ตาม การใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปทั้งในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี real-time RT-PCR ซึ่งใช้อยู่ในปัจจุบันมีข้อจำกัดในการนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการเตรียมสารพันธุกรรม RNA โดยวิธีให้ความร้อน (heat) และการเตรียมสารพันธุกรรมโดยตรงด้วยน้ำยาย่อยสลายเซลล์ (direct lysis) เปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ร่วมกับการประเมินน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพ (enhancers) ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR เพื่อความรวดเร็วและประหยัดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ ลดข้อจำกัดด้านการนำเข้าทรัพยากรทางการแพทย์จากต่างประเทศ สนับสนุนการสอบสวนและการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโควิด-19 อย่างทันท่วงทีในกรณีที่เกิดการระบาดของโรคในวงกว้าง ช่วยให้การตรวจยืนยันผู้ติดเชื้อและการเฝ้าระวังการระบาดของโรคติดเชื้อในพื้นที่เสี่ยงต่าง ๆ มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเป็นตัวอย่างระบบทางเดินหายใจส่วนบนของผู้ป่วย ผู้สัมผัส หรือกลุ่มเสี่ยงที่ส่งตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 ณ ห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างเดือนมกราคม ถึงพฤษภาคม 2563 จำนวน 108 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างป้ายคอ (throat swab) ร่วมกับตัวอย่างป้ายโพรงจมูก (nasopharyngeal swab) ใส่ในอาหารนำส่งสำหรับเชื้อไวรัส (Viral transport media; VTM) หรือ Universal transport media (UTM) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร รวมไว้ในหลอดเดียวกัน และนำส่งในสภาวะที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ภายใน 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR

ตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินและใช้เป็น “วิธีปัจจุบัน” เป็นตัวอย่างที่ผ่านการสกัดสารพันธุกรรม RNA โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin RNA virus (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยใช้ชุดน้ำยา SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA) ซึ่งเป็นวิธีปัจจุบันที่ฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 จากตัวอย่างส่งตรวจผู้ป่วยหรือผู้สัมผัส

การเตรียมสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (genomic RNA)

1) วิธีปัจจุบัน: สกัดสารพันธุกรรม RNA ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์หรือตัวอย่างสิ่งส่งตรวจระบบทางเดินหายใจด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin RNA virus (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) โดยแบ่งตัวอย่างใน VTM หรือ UTM ปริมาตร 200 µl และสกัดสารพันธุกรรมตามกระบวนการของชุดน้ำยาและใช้ RNA บริสุทธิ์ (purified RNA) ปริมาตร 5 µl เป็น RNA ต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา real-time RT-PCR

2) วิธีใหม่: การเตรียมสารพันธุกรรม RNA จากตัวอย่าง throat swab ร่วมกับ nasopharyngeal swab จากหลอดเดียวกัน มีดังนี้ 1) วิธีให้ความร้อน (heat) เตรียมตัวอย่างโดยแบ่งตัวอย่างใน VTM หรือ UTM ปริมาตร 200 µl จากนั้นนำไปทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์ (inactivated) โดยนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 µl ไปใช้เป็น RNA ต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา real-time RT-PCR และ 2) วิธี Direct lysis เตรียมตัวอย่างโดยแบ่งตัวอย่างใน VTM หรือ UTM ปริมาตร

200 µl จากนั้นเติมสารละลาย lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4 และ 150 mM NaCl) ปริมาตร 200 µl วางที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 µl ไปใช้เป็น RNA ต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา real-time RT-PCR

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity test)

ทดสอบความจำเพาะของ primers และ probes ที่จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง ซึ่งก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ เชื้อ MERS-CoV เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A (Influenza A virus) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ B (Influenza B virus) เชื้อโคโรนาไวรัสที่ก่อโรคในคน สายพันธุ์โอ ซี 43 (Human coronavirus OC43) และสายพันธุ์เอช เค ยู (Human coronavirus HKU) จำนวนเชื้อละ 3 สายพันธุ์ และเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อโควิด-19 2 รายแรกที่พบในประเทศไทย จากสิ่งส่งตรวจงานบริการหรือสอบสวนโรค ฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

การเตรียมน้ำยา real-time RT-PCR

1) วิธีปัจจุบัน: เตรียมน้ำยาทดสอบ (Master mix) ปริมาตรรวม 20 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา (reaction) จำนวน 2 ชุด ต่อตัวอย่าง โดยใช้หลอดไมโครทิวป์ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาต่างๆ ลงไป ดังนี้ ชุดที่ 1 สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย RdRp และ Rnase P (duplex real-time RT-PCR) เติม primer WH-NIC IN-F และ WH-NIC IN-R ความเข้มข้น 0.8 µM primer RNase P-F และ RNase P-R ความเข้มข้น 0.8 µM probe WH-NIC IN-P และ probe Rnase P ความเข้มข้น 0.2 µM (ตารางที่ 1) และชุดที่ 2 สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย N เติม primer WH-NIC N-F และ WH-NIC N-R ความเข้มข้น 1 µM และ probe WH-NIC N-P ความเข้มข้น 0.4 µM (ตารางที่ 1) หลังจากนั้นเติม PCR reaction mix ซึ่งประกอบด้วย 2X Reaction mix (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 µl SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, USA) ปริมาตร 0.4 µl เติมสารพันธุกรรม RNA ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ปริมาตร 5 µl ต่อตัวอย่าง และเติมน้ำ DNase/RNase-free water สำหรับปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl ในแต่ละรอบของการทดสอบมีตัวควบคุมบวก (positive control) และตัวควบคุมลบ (no template control) ของแต่ละยีนเป้าหมาย จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Bio-Rad, CFX96 real-time PCR Detection System, USA) ดังนี้ ขั้นที่ 1 โปรแกรม Reverse transcription ใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที ขั้นที่ 2 โปรแกรม Pre-incubation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที (จำนวน 1 รอบ) ขั้นที่ 3 โปรแกรม Amplification ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที Annealing/Extension ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 ทั้งหมด 45 รอบ (cycles)

2) วิธีใหม่: เตรียมน้ำยาทดสอบปริมาตรรวม 20 µl ต่อ 1 ปฏิกิริยา จำนวน 2 ชุด ต่อตัวอย่าง โดยใช้หลอดไมโครทิวป์ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาต่างๆ ลงไป ดังนี้ ชุดที่ 1 สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย RdRp และ Rnase P (duplex real-time RT-PCR) เติม primer WH-NIC IN-F และ WH-NIC IN-R ความเข้มข้น 0.8 µM primer RNase P-F และ RNase P-R ความเข้มข้น 0.8 µM probe WH-NIC IN-P และ probe Rnase P ความเข้มข้น 0.2 µM (ตารางที่ 1) และชุดที่ 2 สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย N เติม primer WH-NIC N-F และ WH-NIC N-R ความเข้มข้น 1 µM และ probe WH-NIC N-P ความเข้มข้น 0.4 µM (ตารางที่ 1) หลังจากนั้นเติม PCR reaction mix ซึ่งประกอบด้วย CAPITAL qPCR Probe Mix, 4x ปริมาตร 5 µl RTase with RNase Inhibitor, 20x ปริมาตร 1 µl เติมสารพันธุกรรม RNA ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ปริมาตร 5 µl

ต่อตัวอย่าง และเติมน้ำ DNase/RNase-free water สำหรับปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl ในแต่ละรอบของการทดสอบมีตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบของแต่ละยีนเป้าหมาย จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Bio-Rad, CFX96 real-time PCR Detection System, USA) ตามขั้นตอนเช่นเดียวกับ “วิธีปัจจุบัน”

ตารางที่ 1 Primer และ Probe ที่ใช้ในการศึกษานี้

ยีนเป้าหมาย	Primer/Probe	Sequence (5’ -> 3’)	Reference
RdRp	WH-NIC IN-F	CTCACCTTATGGGTTGGGATTATC	การศึกษานี้
	WH-NIC IN-R	AGTGAGGCCATAATTCTAAGCATGT	
	WH-NIC IN-P	FAM-TAAATGTGATAGAGCCATGCC-BHQ1	
N	WH-NIC N-F	CGTTTGGTGGACCCTCAGAT	การศึกษานี้
	WH-NIC N-R	CCCCACTGCGTTCTCCATT	
	WH-NIC N-P	FAM-CAACTGGCAGTAACCA- BHQ1	9
RNaseP	RNaseP-F	AGATTTGGACCTGCGAGCG	
	RNaseP-R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
	RNaseP-P	HEX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG- BHQ1	

เปรียบเทียบปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายโดยเติมน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพ (enhancers) จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Tween 20 (0.5%), Glycerol (10, 15, 20%), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (10%), Bovine serum albumin (BSA) (10 mg/mL) และ Triton X-100 (0.1%) ลงในน้ำยาทดสอบ (Master mix) และทำการประเมินประสิทธิภาพของปฏิกิริยา real-time RT-PCR

การวิเคราะห์ข้อมูล

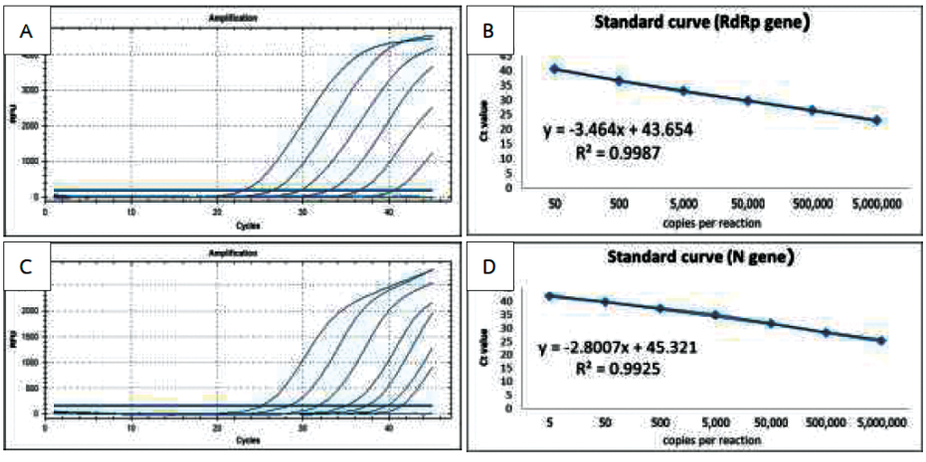
การตรวจสอบผลพิจารณารูปแบบของกราฟ โดยตัวอย่างที่ตรวจพบยีนเป้าหมายต้องมีกราฟในลักษณะคล้ายรูปตัวเอส (S-curve) ร่วมกับการพิจารณาค่า Cycle threshold (Ct) โดยค่า Ct ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมตามที่กำหนด ดังนี้ ยีน RdRp และ N ถ้าพบค่า Ct มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 42 รายงานผลเป็นผลบวก (detected) และยีน RNase P ถ้าพบค่า Ct มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 รายงานผลเป็นผลบวก (detected) หากตรวจไม่พบสัญญาณของสารเรืองแสง หรือค่า Ct ไม่เป็นไปตามเกณฑ์จะรายงานผลเป็นผลลบ (not detected) นอกจากนี้ ประเมินประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA ด้วยวิธี heat และ direct lysis เปรียบเทียบกับการใช้น้ำยาสำเร็จรูป และประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา enhancer ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน โดยวิเคราะห์ค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของวิธีทดสอบ[11]

ผล

ความจำเพาะและความไวของวิธี real-time RT-PCR

การทดสอบความจำเพาะกับเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงซึ่งก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ เชื้อ MERS-CoV เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A (Influenza A virus) เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ B (Influenza B virus) เชื้อโคโรนาไวรัสที่ก่อโรคในคน สายพันธุ์โอ ซี 43 (Human coronavirus OC43) และสายพันธุ์เอช เค ยู (Human coronavirus HKU) พบว่า primer และ probe ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง

ผลการทดสอบความไวของยีนเป้าหมาย RdRp และ N พบว่า ยีนเป้าหมาย RdRp และยีน N มีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 50 copies ต่อ reaction และ 5 copies ต่อ reaction ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 Amplification curve และ Standard curve แสดงความไวในการตรวจหายีน RdRp (A, B) และยีน N (C, D) ที่จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นใหม่ในสภาวะที่เติม enhancer mixes (0.5% Tween 20 และ 15% Glycerol)

การประเมินประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA

ผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 108 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก 35 ตัวอย่าง และผลลบ 73 ตัวอย่างเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin RNA virus สำหรับสกัดสารพันธุกรรม และน้ำยา SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี real-time RT PCR (วิธีปัจจุบัน) พบว่าวิธี heat และ direct lysis ให้ผลบวกสอดคล้องกันร้อยละ 97.14 และ 100 ตามลำดับ และให้ผลลบสอดคล้องกันร้อยละ 95.89 และ 94.52 ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วยยีน RdRp (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาค่า Ct ผลการตรวจหายีน RdRp จากตัวอย่างที่เตรียมโดยวิธี heat และ direct lysis ข้างต้น พบว่ามีค่า Ct ต่างจากวิธีปัจจุบัน 1.63 และ 2.03 cycles ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

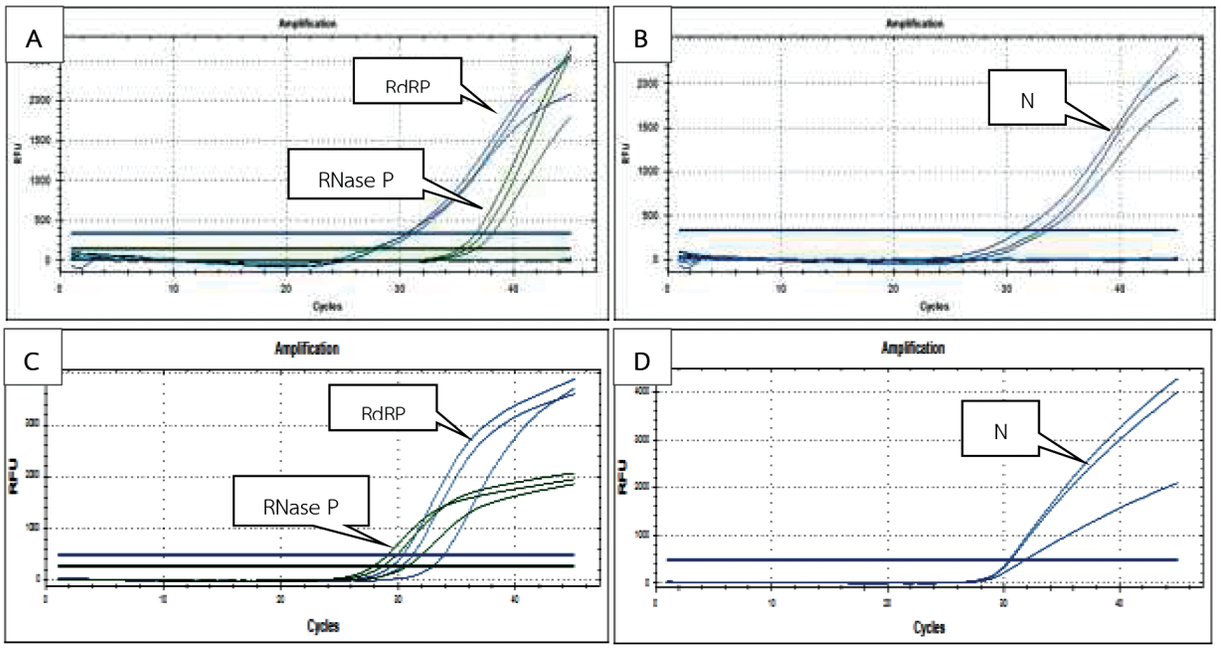
ตารางที่ 2 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA เปรียบเทียบกับน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป

วิธีเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรม RNA/ ยีนเป้าหมาย	ค่าความไว (sensitivity) (ร้อยละ)	ค่าความจำเพาะ (specificity) (ร้อยละ)	ค่าความแตกต่างของ Ct*		
			ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
Heat					
- RdRp	97.14	95.89	0.08	8.78	1.63
- Rnase P	100	-	0.05	3.61	0.90
Direct lysis					
- RdRp	100	94.52	0.04	9.51	2.03
- RNase P	100	-	0.01	4.89	1.42

* ค่าความแตกต่างของ Ct ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการใช้น้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป

การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา enhancer ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR

ผลการทดสอบเปรียบเทียบน้ำยาเพิ่มประสิทธิภาพจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Tween 20 (0.5%), Glycerol (10, 15, 20%), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (10%), Bovine serum albumin (BSA) (10 mg/mL) และ Triton X-100 (0.1 %) โดยเติมลงในน้ำยาทดสอบสำหรับส่งเสริมปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยใช้ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งที่มีค่า Ct ต่างๆ กันระหว่าง Ct 35.81 ถึง 42.00 รวมจำนวน 7 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ให้ผลบวก 6 ตัวอย่าง และผลลบ 1 ตัวอย่าง) ผลการตรวจหายีน RdRp เมื่อเติมน้ำยา enhancer ชนิด Tween 20 (0.5%), Glycerol (10 และ 15%) และ BSA ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL พบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจยีนเป้าหมาย RdRp ร้อยละ 100 (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณารูปแบบของกราฟและสัญญาณสารเรืองแสงที่เกิดจากปฏิกิริยา พบว่าน้ำยา enhancer ชนิด Tween 20 (0.5%) และ Glycerol (15%) ให้กราฟลักษณะคล้ายรูปตัวเอส (S-curve) และสัญญาณสารเรืองแสงสูงกว่าเมื่อเติม Glycerol (10%) และ BSA ดังนั้นจึงนำน้ำยา enhancer ชนิด Tween 20 (0.5%) และ Glycerol (15%) มาใช้ร่วมกันเป็น enhancer mixes ก่อนนำไปทดสอบประเมิน ผลการทดสอบพบว่า enhancer mixes มีค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจยีนเป้าหมาย RdRp ร้อยละ 100 (ตารางที่ 3) อีกทั้งช่วยลดการเกิดผลลบปลอมและสามารถเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาทำให้กราฟ amplification curve มีสัญญาณสูงขึ้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 Amplification curve แสดงการตรวจหายีน RdRp ร่วมกับ RNase P ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ด้วยวิธี duplex real-time RT-PCR (A, C) และยีน N (B, D) ด้วยวิธี uniplex real-time RT-PCR จากตัวอย่าง throat swab ร่วมกับ nasopharyngeal swab โดยรูป A และ B แสดงรูปสัญญาณ Amplification curve ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ในสภาวะที่ไม่ได้เติม enhancer mixes; รูป C และ D แสดงรูปสัญญาณ Amplification curve ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ในสภาวะที่เติม enhancer mixes (0.5% Tween 20 และ 15% Glycerol)

ตารางที่ 3 การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา enhancer ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR

ชนิด **enhancer**	ความเข้มข้น	ค่าความไว (**sensitivity**) (ร้อยละ)	ค่าความจำเพาะ (**specificity**) (ร้อยละ)	ค่าความแตกต่างของ Ct*		
				ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
Tween 20	0.5%	100	100	0.18	1.75	0.94
Glycerol	10%	100	100	0.17	2.31	0.58
	15%	100	100	0.05	2.03	0.90
	20%	86	100	0.59	1.76	1.14
DMSO	10%	75	100	0.26	0.53	0.41
BSA	10 mg/mL	100	100	0.12	0.76	0.37
Triton X-100	0.1%	75	100	0.03	3.58	0.92
Tween 20 + Glycerol	0.5% + 15%	100	100	0.04	1.00	0.52

วิจารณ์

วิธี real-time RT-PCR เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกสำหรับใช้ในการตรวจยืนยันเชื้อก่อโรคโควิด-19 การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธี real-time RT-PCR จากข้อมูลสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ถอดรหัสจากตัวอย่างผู้ป่วย 2 รายแรกในประเทศไทย[7] และเปรียบเทียบกับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่พบในเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน เพื่อยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนนำมาออกแบบ primer และ probe ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย N และ RdRp[2] โดยวิธี real-time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้แบ่งออกเป็น 2 ชุด ตามชนิดของยีนเป้าหมาย ดังนี้ชุดที่ 1 เป็นการตรวจหายีน N และชุดที่ 2 เป็นการตรวจหายีน RdRp ร่วมกับยีน Rnase P ของคน ซึ่งยีน RNase P นี้ ใช้เป็นตัวควบคุมภายในหรือตัวควบคุมกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม (internal control หรือ extraction control)[6]

ด้านความจำเพาะของ primer และ probe สำหรับยีน RdRp และ N ที่ใช้ในการศึกษานี้พบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ทดสอบอื่น ๆ เมื่อพิจารณาความไวในการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 พบว่ายีน RdRp มีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 50 copies ต่อ reaction ขณะที่ยีน N สามารถตรวจพบที่ความเข้มข้น 5 copies ต่อ reaction การศึกษาในปี 2020 Vogels CBF และคณะได้ตรวจประเมินความไวของ primer และ probe ที่จำเพาะกับยีน RdRp พบว่ามีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่ำสุด 500 copies ต่อ reaction[12] ขณะที่ Corman VM และคณะ รายงานความไวของยีน RdRp ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 3.7 copies ต่อ reaction[2] โดยความไวในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายที่แตกต่างกันนี้ขึ้นกับการออกแบบ primer probe องค์ประกอบของน้ำยา และสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของแต่ละยีนเป้าหมาย

การพัฒนาวิธีการสกัดสารพันธุกรรม RNA ด้วยวิธีพื้นฐาน ซึ่งมีกระบวนการที่ปฏิบัติได้ง่าย สะดวก และต้นทุนต่ำ มีความสำคัญต่อการสอบสวนหรือตรวจวินิจฉัยโรคในวงกว้าง ในการศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการเตรียมสารพันธุกรรม RNA 2 วิธี ดังนี้ 1) การ heat ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ 2) การเตรียมโดยใช้ lysis buffer ซึ่งปรับปรุงวิธีจาก Shatzkes K และคณะ[13] โดยใช้สายละลาย 10 mM Tris-HCl pH 7.4 และ 150 mM NaCl ปริมาตร 200 µl ต่อตัวอย่างปริมาตร 200 µl, (1:1 v/v) พบว่าวิธี heat มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 97.14 และ 95.89 ตามลำดับ ขณะที่วิธี direct lysis, enhancer mixes 5.3 µl (0.5% Tween 20, 15% glycerol)

มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 100 และ 94.52 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2014 ซึ่ง Shatzkes K และคณะ ได้พัฒนาน้ำยา lysis buffer โดยใช้หลักการของ non-ionic detergent เพื่อใช้ในการสกัดสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus)[13] นอกจากนี้ในปี 2020 Grant PR และคณะได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จากตัวอย่าง swab ใน VTM โดยวิธีต่างๆ ได้แก่ วิธีการสกัดสารพันธุกรรม RNA การให้ความร้อน (heat) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และแบบที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม โดยเติม VTM ปริมาตร 2 µl ใส่ในหลอด PCR และทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยตรง (Direct sample transfer) พบว่าวิธี Direct sample transfer มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 98 และ 100 ตามลำดับ[14] จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีซึ่งไม่ผ่านกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมสามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกในการเตรียมสารพันธุกรรม RNA เพื่อตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 โดยวิธี real-time RT-PCR ได้

การเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยา real-time RT-PCR หลังจากเติมสารพันธุกรรม RNA ลงในหลอดทดลอง โดยทั่วไปทำได้โดยเติมสารบางชนิดที่ส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาในหลอดทดลอง เช่น DMSO, BSA, Glycerol, Tween 20 และ Triton X-100 เป็นต้น การศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 1-10% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ได้ร้อยละ 33 ขณะที่ glycerol สามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ประมาณร้อยละ 5 อย่างไรก็ตามบางรายงานพบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 10% มีผลไปลดประสิทธิภาพการทำงานของ DNA polymerase ร้อยละ 50[15] จะเห็นได้ว่าการเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยา real-time RT-PCR อาจขึ้นกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงในแต่ละสภาวะ ในการศึกษานี้พบว่าเมื่อเติมน้ำยา enhancer mixes ซึ่งประกอบด้วย Tween 20 (0.5%) และ Glycerol (15%) ทำให้วิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยยีน RdRp มีค่าความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 นอกจากนี้ยังมีผลช่วยลดการเกิดผลลบปลอม (false negative) และเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาทำให้กราฟ amplification curve มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

สรุป

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งก่อโรคโควิด-19 จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ throat swab ร่วมกับ nasopharyngeal swab ในอาหารนำส่ง VTM หรือ UTM สามารถเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรมได้โดยใช้วิธี direct lysis หรือ heat ซึ่งมีความไวร้อยละ 100 และ 97.14 และความจำเพาะร้อยละ 94.52 และ 95.89 ตามลำดับ ทำให้ช่วยลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและมีความรวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้การเติมน้ำยา enhancer mixes (0.5% Tween 20 และ 15% Glycerol) ในปฏิกิริยา real-time RT-PCR ซึ่งมีความไวและความจำเพาะในการตรวจยีนเป้าหมายร้อยละ 100 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยลดการเกิดผลลบปลอมและช่วยเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ดังนั้นวิธีการเตรียมสารพันธุกรรมโดยตรงโดยไม่ผ่านกระบวนการสกัดสารพันธุกรรมและการเติม enhancer mixes ที่พัฒนาควบคู่กับชุดน้ำยาตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อโควิด-19 ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR (DMSc COVID-19 real-time RT-PCR) นี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ตามโรงพยาบาลและห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องตรวจทั่วประเทศ และช่วยส่งเสริมการเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคภายในประเทศให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และบริษัท สยามไบโอซายน์ ในการสนับสนุนงบประมาณและน้ำยาทดสอบเพื่อใช้ในการพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจวินิจฉัยโรคโควิค-19 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ช่วยจัดเตรียมน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่ และบุคลากรฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจทุกท่านที่ทุ่มเท มุ่งมั่น ทำให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) situation report – 146: data as received by WHO from national authorities by 10:00 CEST, 14 June 2020. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 14]; [17 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200614-covid-19-sitrep-146.pdf?sfvrsn=5b89bdad_6.
2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill 2020; 25(3): 2000045. (8 pages).
3. Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, Lin YY, Luo YH, Lin YT, et al. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. Int J Mol Sci 2020; 21(7): 2657. (19 pages).
4. Chittaganphich M. COVID-19. Bull Dept Med Sci 2020; 62(1): 1-5.
5. Chen Y, Chen L, Deng Q, Zhang G, Wu K, Ni L, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. J Med Virol 2020; 92(7): 833-40.
6. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. [online]. 2020; [cited 2020 May 15]; [59 screens]. Available from: URL: https://www.fda.gov/media/134922/download.
7. Okada P, Buathong R, Phuygun S, Thanadachakul T, Parnmen S, Wongboot W, el al. Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. Euro Surveill 2020; 25(8). 2000097. (5 pages).
8. Johnson G, Nolan T, Bustin SA. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. Methods Mol Biol 2013; 943: 1-16.
9. World Health Organization. real-time RT-PCR protocol for the detection of avian influenza A(H7N9) virus. [online]. 2013; [cited 2020 May 15]; [6 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_realtime_rt_pcr_protocol_a_h7n9.pdf.
10. Harada S. DNA and RNA extractions from mammalian samples. In: Micic M. Sample preparation techniques for soil, plant, and animal samples. New York: Springer Science Business Media; 2016. p. 125-138.
11. Van Stralen KJ, Stel VS, Reitsma JB, Dekker FW, Zoccali C, Jager KJ. Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. Kidney Int 2009; 75(12): 1257-63.
12. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-COV-2 qRT-PCR primer-probe sets. medRxiv. [serial online]. 2020; [cited 2020 May 15]; XX(XX): [20 screens]. Available from: URL: https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2020/04/26/2020.03.30.20048108.full.pdf.
13. Shatzkes K, Teferedegne B, Murata H. A simple, inexpensive method for preparing cell lysates suitable for downstream reverse transcription quantitative PCR. Sci Rep 2014; 4: 4659. (7 pages).

14. Grant PR, Turner MA, Shin GY, Nastouli E, Levett LJ. Extraction-free COVID-19 (SARS-CoV-2) diagnosis by RT-PCR to increase capacity for national testing programmes during a pandemic. bioRxiv. [serial online]. 2020; [cited 2020 May 15]; XX(XX): [6 screens]. Available from: URL: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.06.028316v1.full.pdf.
15. Montgomery JL, Wittwer CT. Influence of PCR reagents on DNA polymerase extension rates measured on real-time PCR Instruments. Clin Chem 2014; 60(2): 334-40.

Development of DMSc COVID-19 real-time RT-PCR

Pilailuk Akkapaiboon Okada[1] Warawan Wongboot[1] Thanutsapa Thanadachakul[1] Siripaporn Puygun[1] Sirichol Kala[1] Wandee Meechalard[1] Sunthareeya Waichroen[1] Malinee Chittaganpitch[2] and Ballang Uppapong[1]

[1]National Institute of Health of Thailand, [2]Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Development of diagnostic tests for detection of emerging infectious agents in patients, contact cases and high-risk group is critical for disease control and early effective treatment. In this study, we aimed to develop DMSc COVID-19 real-time RT-PCR assay for detection of RdRp and N gene which are specific for SARS-CoV-2 causing COVID-19, to evaluate a simplified extraction-free methods (heat and direct lysis) and to evaluate effects of five enhancers; Tween 20 (0.5%), Glycerol (10, 15, 20%), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (10%), Bovine serum albumin (BSA) (10 mg/mL) and Triton X-100 (0.1%) on amplification efficiency. The results demonstrated that the real-time RT-PCR assay had analytical sensitivity to detect RdRp and N gene at 50 and 5 virus copies per reaction, respectively. Among extraction-free methods, heat and direct lysis showed diagnostic sensitivity of 97.14 and 100% and specificity of 95.89 and 94.52% respectively. Enhancer mixes composed of Tween 20 (0.5%) and Glycerol (15%) increased diagnostic sensitivity and specificity up to 100%. Our study revealed that the DMSc COVID-19 real-time RT-PCR assay could be used to amplify RNA without extraction process. This assay could serve as a rapid and cost-effective diagnostic method to increase capacity of COVID-19 detection for monitoring and diagnostic purposes.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, real-time RT-PCR