

การพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี Reverse Transcription Droplet Digital PCR

นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา ญัฐกุล บุญเนื่อง วิมาลา อินอุ่นโชติ วริษฐา แสงดี และสุริศเมธ มหาศิริมงคล
กองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การแพร่ระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 ทั่วโลกส่งผลกระทบต่อทั้งทางสาธารณสุข สังคม และเศรษฐกิจ ทำให้มีการเร่งพัฒนาทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์อย่างมากในด้านการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ การรักษา และวัคซีน เพื่อควบคุมการระบาดของไวรัสนี้ การตรวจวัดปริมาณเชื้อ SARS-CoV-2 มีความสำคัญในการศึกษาวิจัยด้านพยากรณ์โรคและการติดตามผลการรักษา รวมทั้งการเตรียมอาร์เอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งการใช้เทคนิค quantitative real-time PCR เพื่อตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมมีข้อจำกัดเรื่องความแม่นยำ และจำเป็นต้องทำ standard curve ควบคู่กับการตรวจตัวอย่างทุกครั้ง การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค reverse-transcription droplet digital PCR (RT-ddPCR) โดยการตรวจยีน *RNA dependent RNA polymerase (RdRp)* มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจที่ 800 copies/ml ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ โดยมีค่าการวัดเป็นเส้นตรงช่วง 1.8×10^3 ถึง 5.54×10^6 copies/ml วิธีนี้สามารถนำไปใช้ตรวจปริมาณเชื้อ SARS-CoV-2 ในตัวอย่างอาร์เอ็นเออ้างอิงและตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อ การพัฒนาวิธีการเก็บตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยให้มีคุณภาพและการรักษาสภาพอาร์เอ็นเอของไวรัสในตัวอย่างตรวจจะช่วยให้การตรวจวัดปริมาณไวรัสมีความถูกต้องมากขึ้น

คำสำคัญ: โคโรนา-19, SARS-CoV-2, การตรวจวัดปริมาณ, RT-ddPCR

Corresponding author E-mail: nuanjun.w@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 25 August 2020

Accepted: 7 September 2020

บทนำ

โรคกลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus disease 2019: COVID-19) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสกลุ่มโคโรนาชื่อ Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) หรือชื่อที่องค์การอนามัยโลกเคยใช้คือ ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (2019-nCoV) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสเหมือน mRNA (positive-sense single-stranded RNA) พบผู้ป่วยรายแรกในเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน ในเดือนธันวาคม 2562 และเกิดการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในประเทศจีนและประเทศอื่นทุกภูมิภาคทั่วโลก^(1, 2, 3) ไวรัสสามารถแพร่จากคนสู่คนจากการไอหรือจามของผู้ติดเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจผ่านทางจมูก ปาก หรือตา ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มีอาการคล้ายหวัดหรือไม่มีอาการ ส่วนน้อยประมาณร้อยละ 20 มีอาการรุนแรง ปอดอักเสบ หายใจลำบาก จนถึงขั้นเสียชีวิต โดยมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรงในผู้ที่มิระบบภูมิคุ้มกันเสื่อมหรือบกพร่อง เช่น ผู้สูงอายุ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน หรือโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยจับกับ Angiotensin-converting enzyme 2 receptor (ACE2) ซึ่งพบได้ที่ผิวเซลล์เยื่อทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่าง รวมทั้งต่อมน้ำลาย หัวใจ ไต ทางเดินอาหาร หลังรับเชื้อ 2-14 วันจะเริ่มแสดงอาการ ไวรัสมักขับออกในสารคัดหลั่งระบบทางเดินหายใจ และทางเดินอาหาร^(4, 5)

การตรวจการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ใช้การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในตัวอย่างจากผู้ป่วย หรือผู้เข้าข่ายต้องสงสัย หรือมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อ วิธีตรวจที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลกคือ real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) ซึ่งเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมจำเพาะของไวรัส⁽⁶⁾ ยีนเป้าหมายการตรวจที่ใช้กันมากได้แก่ยีน *RNA dependent RNA polymerase (RdRp)*, *nucleocapsid (N)*, *envelop (E)* และ *spike (S)* โดยเป็นการตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) รายงานผลเป็นพบหรือไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัส ค่า cycle threshold (Ct) ของแต่ละตัวอย่างเป็นการบอกแนวโน้มของการพบเชื้อมากหรือน้อย แต่ไม่สามารถระบุปริมาณเป็นจำนวน copy เว้นแต่มีการตรวจแบบวิธี quantitative real-time PCR เปรียบเทียบค่า Ct ที่ได้กับตัวอย่างอาร์เอ็นเอ/ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบจำนวน copy (calibrator) โดยการทำให้ standard curve เนื่องจากค่า Ct จากการตรวจแต่ละครั้งมีความผันแปรได้สูง จึงต้องทำการตรวจแบบ 3 ซ้ำ (triplicate) ทั้งตัวอย่างตรวจและตัวอย่างมาตรฐาน และจำเป็นต้องทำ standard curve ทุกครั้งของการตรวจ ทำให้ไม่สะดวก สิ้นเปลืองทรัพยากรและค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ค่าปริมาณที่ได้ถือเป็นค่าเปรียบเทียบ (relative quantitative number) เพราะเป็นการทำปฏิกิริยาคนละหลอดภายใต้สภาวะมาตรฐานว่าตัวอย่างและ calibrator มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเท่ากัน

วิธีการตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค digital PCR (dPCR) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวของการตรวจวัดเชิงปริมาณด้วยวิธี real-time PCR^(7, 8, 9, 10, 11) โดยใช้หลักการแบ่งปฏิกิริยา PCR (partition) ออกเป็นจำนวนหลายพันปฏิกิริยาในปริมาตรขนาดเล็กระดับนาโนลิตร ซึ่งทำได้ 2 ระบบ คือ การใช้เพลทหลุมขนาดเล็ก (nanoplate-based dPCR) และ การใช้ water-in-oil emulsion แทนหลุมปฏิกิริยา (droplet-based dPCR; ddPCR) โดยมีขั้นตอนเจือจางดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนผสมกับน้ำยา PCR ที่มี primer และ probe จำเพาะก่อนแบ่ง partition หลังจากสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณรอบสุดท้ายในเครื่อง PCR แล้วจึงตรวจวัดสัญญาณแสงในแต่ละ partition ที่เป็นเป็นบวกหรือลบ (end point PCR) การเจือจางดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนการทำ PCR เพื่อทำให้เกิดการกระจายตัวในแต่ละ partition โดยอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมจะมีดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 copy ในบาง partition และไม่มีดีเอ็นเอในบาง partition การคำนวณอัตราส่วนระหว่าง partition บวกที่เกิด PCR product จากการมีดีเอ็นเอเป้าหมาย กับ partition ทั้งหมดตามสถิติปัวซอง (Poisson statistical analysis) ได้ค่าจำนวน copy ของแต่ละตัวอย่างอย่างถูกต้อง สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างกันของจำนวน copy ในแต่ละตัวอย่างได้อย่างแม่นยำกว่าวิธี real-time RT-PCR จึงมีการนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย^(9, 11, 12, 13) เช่น การตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน (gene expression) การวัดปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viral load) ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนในชิ้นเนื้อมะเร็ง (rare mutation of cancer) หรือตรวจวัดปริมาณท่อนดีเอ็นเอต้นแบบ (library preparation

quantification) สำหรับการตรวจลำดับสารพันธุกรรมชนิด next generation sequencing (NGS) การศึกษาได้พัฒนาเทคนิค RT-ddPCR เพื่อตรวจวัดปริมาณ SARS-CoV-2 โดยใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเออ้างอิง และทดสอบกับตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อ เพื่อการเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอมาตรฐาน และเตรียมห้องปฏิบัติการรองรับงานตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณไวรัสในตัวอย่างตรวจจากผู้ติดเชื้อเพื่อประเมินประสิทธิภาพการรักษา

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง SARS-CoV-2 RNA

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 เท่ากับ 2×10^5 PFU/ml (ได้รับอนุเคราะห์จากฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ปริมาตร 300 μ l มาสกัดเป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 60 μ l (เท่ากับ 1×10^6 PFU/ml ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและเครื่องอัตโนมัติ (Chemagic™ Viral DNA/RNA 300 Kit H96 และ Chemagic™ 360 Perkin Elmer, Massachusetts, USA.) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนเอกสารกำกับของชุดน้ำยาและการใช้เครื่องมือ

ตัวอย่างผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2

ตัวอย่างอาร์เอ็นเอของผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่เป็นตัวอย่างเหลือจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการตรวจ COVID-19 ด้วยวิธี real-time RT-PCR จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างสกัดจากน้ำลายจำนวน 4 ตัวอย่าง และสกัดจาก nasopharyngeal swab และ/หรือ nasal swab (NPS/NS) จำนวน 17 ตัวอย่าง ซึ่งใช้ชุดน้ำยาและเครื่องมือการสกัดเช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเซลล์

การทำ RT-ddPCR

ใช้ primer และ probe สำหรับยีน *RdRp* ของ SARS-CoV-2 ตามวิธีการตรวจ RT-PCR ที่พัฒนาโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (อยู่ระหว่างตีพิมพ์เผยแพร่) มีลำดับเบส คือ *RdRp*-Fw primer; 5'-CTCACCTTATGGGTGGGATTATC-3' และ *RdRp*-Rv primer; 5'-AGTGAG-GCCATAATTCTAAGCATGT-3' เป็นชนิด high affinity purification (สังเคราะห์โดย Bio Basic Inc. Ontario, Canada) มีผลิตภัณฑ์ขนาด 73 bp และ *RdRp* probe; FAM-3'-TAAATGTGATAGAGCCATGCC-5'-BHQ1 ชนิด HPLC purification (สังเคราะห์โดย Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) ใช้ชุดน้ำยา One step RT ddPCR Advanced Kit for Probe (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) โดยในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 20 μ l ประกอบด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase และ DNA Polymerase ในบัฟเฟอร์ที่มีสารเคมีองค์ประกอบการทำ RT-PCR และ *RdRp* primers/probe หลังจากเติมตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 μ l นำไปทำ partition แบบ water-in-oil emulsion ด้วยเครื่อง droplet generator (QX200™ AutoDG Droplet Digital PCR System, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) ได้ droplet ขนาดประมาณ 1 นาโนลิตร ซึ่งในทุกการทดลองมีการทำ reagent control โดยใช้น้ำบริสุทธิ์แทนตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ทำการเพิ่มปริมาณในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (T-100™, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) ตั้งอุณหภูมิที่ 45 °C นาน 60 นาที เพื่อทำ cDNA และ ที่ 95 °C นาน 10 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ reverse transcriptase พร้อมกระตุ้น DNA polymerase แล้วจึงทำการเพิ่มปริมาณยีน *RdRp* จำนวน 40 รอบ ที่ 95 °C นาน 15 วินาที และ 50 °C นาน 1 นาที หลังจากนั้นจึงทำลายเอนไซม์ที่เหลือและทำให้ droplet มีความแข็งแรงที่ 98 °C นาน 10 นาที และ 4 °C อย่างน้อย 10 นาที อ่านสัญญาณแสง FAM channel ด้วยเครื่องอ่าน Droplet (QX200™ Droplet Reader, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลด้วย QuantaSoft™ Software v.1.7.4.0917 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) จากค่า droplet ที่ให้ผลบวก และ จำนวน droplet ทั้งหมดคำนวณเป็นค่า copies/ μ l ของ reaction และ ค่า 95% confidential interval (95% CI) เมื่อคูณด้วย 20 ซึ่งเป็นปริมาตรรวมในการทำ RT-ddPCR จะได้ค่าเป็น copies/reaction หรือเท่ากับจำนวน copy ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 μ l ใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2013 ในการ plot กราฟ และคำนวณค่าความสัมพันธ์ R^2 ระหว่างจำนวน copy และค่าการเจือจาง หรือค่า Ct

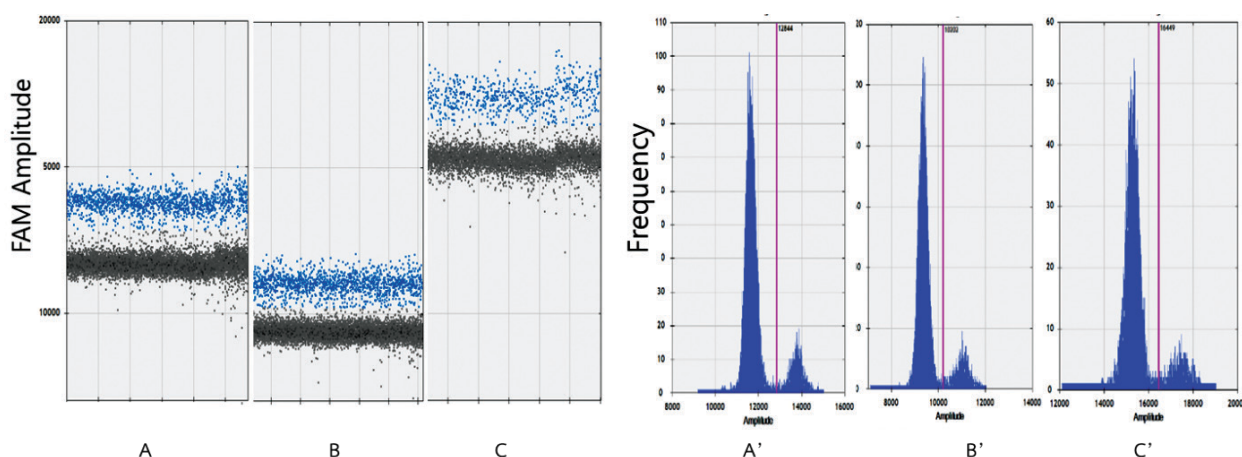
การทดสอบพารามิเตอร์ในการทำ RT-ddPCR

เพื่อหาสภาวะเหมาะสมในการทำ RT-ddPCR เพื่อตรวจวัดปริมาณ SARS-CoV-2 โดยการตรวจวัดยีน *RdRp* ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบ (1) ความเข้มข้นของ probe/primer ที่ 900/250 nM, 600/250 nM และ 600/300 nM (2) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน annealing/extension ระหว่างช่วงอุณหภูมิ 50–59 °C (3) ช่วงความสามารถในการตรวจ (detection range) โดยเจือจางตัวอย่าง SAR-S-CoV-2 RNA ที่มีค่า Ct เท่ากับ 20.31 จากการตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR ที่ 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/20,000, 1/40,000, 1/80,000, 1/100,000, และ 1/1,000,000 (4) อัตราส่วนการเจือจางตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมก่อนการทำ RT-ddPCR โดยทดสอบตัวอย่างอาร์เอ็นเอจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีค่า Ct เท่ากับ 18.24, 24.08, และ 28.32

ผล

การทดสอบความเข้มข้นของ primer/probe

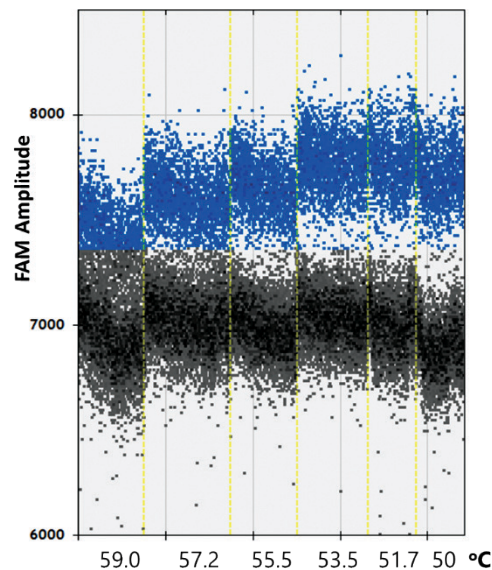
จากการใช้ primer/probe ที่ความเข้มข้น 900/250, 600/250, และ 600/300 nM ในการทำ RT-ddPCR ตรวจวัดค่าปริมาณไวรัสได้เท่ากับ 3,200 3,100 และ 2,860 copies/reaction ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าสัญญาณแสง (amplitude) ของ droplet ที่ให้ผลลบ (negative droplet) และ droplet ที่ให้ผลบวก (positive droplet) พบว่าความเข้มข้น primer/probe ที่ 900/250 nM ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นตามคำแนะนำในคู่มือที่น่ายา ให้ค่า FAM amplitude ของกลุ่ม negative droplet ไม่สูงจนเกินไป และมีระยะห่างจากกลุ่ม positive droplet กว้างกว่าที่ความเข้มข้นอื่น (ภาพที่ 1) จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 900/250 nM ในการใช้งานต่อไป



ภาพที่ 1 แสดง One-dimensional scatter plots (A, B, C) และ histograms (A', B', C') ของ droplet ที่ให้ผลบวก (แถบบนสีน้ำเงิน) และผลลบ (แถบล่างสีดำ) ด้วยวิธี RT-ddPCR เปรียบเทียบระหว่าง primer/probe ที่ความเข้มข้น 900/250 nM (A, A'), 600/250 nM (B, B'), และ 600/300 nM (C, C')

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *RdRp* ในขั้นตอน annealing/extension

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *RdRp* ในขั้นตอน annealing/extension ระหว่างช่วงอุณหภูมิที่ 50 – 59 °C พบว่าที่ 59 °C มี droplet รวมเป็นกลุ่มเดียว และที่ 57.2 °C และ 55.5 °C เริ่มมี droplet แยกเป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่ชัดเจน ส่วนที่ 50.0 – 53.5 °C สามารถแยกกลุ่ม negative droplet และ positive droplet ออกจากกันได้มากขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 50 °C แยกได้ชัดเจนมากที่สุด (ภาพที่ 2) จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 50 °C สำหรับการทดลองต่อไป



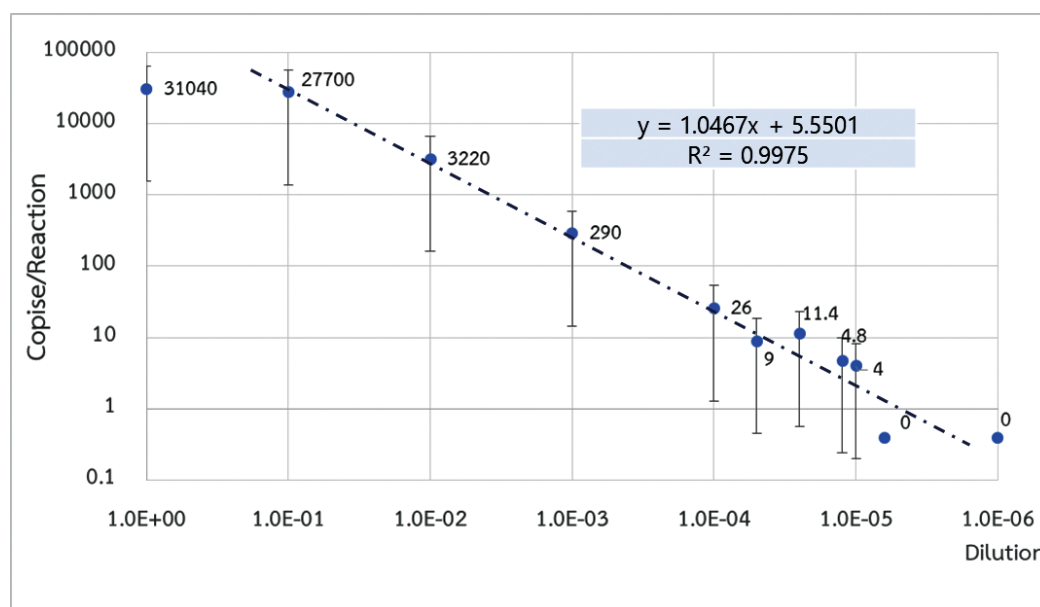
ภาพที่ 2 แสดง One-dimensional scatter plots ของ droplet ที่ให้ผลบวก (สีน้ำเงิน) และผลลบ (สีดำ) ด้วยวิธี RT-ddPCR ที่ใช้อุณหภูมิ annealing/extension ที่ 59.0, 57.2, 55.5, 53.5, 51.7 และ 50.0 °C

การทดสอบช่วงความสามารถในการตรวจวิเคราะห์

การตรวจตัวอย่าง SAR-S-CoV-2 RNA ที่มีค่า Ct เท่ากับ 20.31 จากวิธี real-time RT-PCR โดยเจือจางที่อัตราส่วน 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/20,000, 1/40,000, 1/80,000, 1/100,000, และ 1/1,000,000 ก่อนตรวจวัดปริมาณยีน *RdRp* ด้วย RT-ddPCR ได้ค่า copies/reaction ดังแสดงในตารางที่ 1 การ plot กราฟผลการทดลองพบว่ามีช่วงความสามารถในการตรวจวัดที่เป็นเส้นตรง (linearity detection range) ที่ $R^2 = 0.9975$ อยู่ที่ 9 – 27,700 copies/reaction ซึ่งใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 μ l (เท่ากับ $1.8 \times 10^3 - 5.5 \times 10^6$ copies/ml ของ RNA sample) โดยมีค่าต่ำสุดของการวัดได้ที่ 4 copies/reaction (800 copies/ml ของ RNA sample) ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 1 จำนวน copies/reaction ของ SARS-CoV-2 ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสที่อัตราส่วนเจือจางต่างๆ และตรวจวัดยีน *RdRp* ด้วยวิธี RT-ddPCR

RNA sample dilution	positive droplet (number)	negative droplet (number)	copies/reaction (95% CI*)
1	10,793	3,937	31,040 (32,592-29,488)
1:10	10,891	4,851	27,700 (29,085-26,315)
1:100	1,533	10,486	3,220 (3,381-3,059)
1:1,000	169	13,598	290 (304-275)
1:10,000	17	15,491	26 (27-24)
1:20,000	4	10,415	9 (9.45-8.55)
1:40,000	7	14,555	11.4 (11.97-10.85)
1:80,000	3	14,558	4.8 (5.04-4.56)
1:100,000	2	11,492	4 (4.2-3.8)
1:1,000,000	0	16,081	0



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการเจือจางของตัวอย่างอาร์เอ็นเอกับปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 โดยการตรวจยีน *RdRp* ด้วยวิธี RT-ddPCR

อัตราส่วนการเจือจางของตัวอย่างอาร์เอ็นเอเปรียบเทียบกับค่า C_t ที่ได้จาก real-time RT-PCR

ทดสอบอัตราส่วนการเจือจางของตัวอย่างอาร์เอ็นเอก่อนการทำ RT-ddPCR โดยตรวจวัดจำนวนยีน *RdRp* ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่มีค่า C_t เท่ากับ 18.24 นำมาเจือจางที่ 1/10,000 และ 1/1,000 ส่วนตัวอย่างที่มีค่า C_t เท่ากับ 24.08 นำมาเจือจางที่ 1/100 และ 1/10 และตัวอย่างที่มีค่า C_t เท่ากับ 28.32 นำมาเจือจางที่ 1/10 จากผลการทดลองพบว่า จำนวน copies/reaction ที่ได้มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนการเจือจาง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวน copies/reaction ของ SARS-CoV-2 จากการตรวจหาปริมาณด้วยวิธี RT-ddPCR ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่มีค่า Ct จากการทำ real-time RT-PCR

sample ID	real-time RT-PCR (Ct)	dilution of RNA sample	RT-ddPCR* (copies/reaction)
A	18.24	1: 1000, 1:10000	7480, 702
B	24.08	1:10, 1:100	11540, 922
C	28.32	1:10	1180

* ค่า copies/reaction ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 µl และใช้ปริมาตร 20 µl ในการทำ RT-ddPCR

การเปรียบเทียบปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 จากวิธี RT-ddPCR กับ real-time RT-PCR ในตัวอย่างผู้ติดเชื้อ

ทดลองใช้วิธี ddPCR ด้วยพารามิเตอร์ที่ทดสอบได้ในการวัดค่าปริมาณไวรัสในตัวอย่างอาร์เอ็นเอของผู้ติดเชื้อจำนวน 21 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่เหลือจากการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR พบว่าค่า copies/reaction มีความสัมพันธ์กับค่า Ct โดยมีค่า $R^2 = 0.9392$ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากผู้ติดเชื้อด้วยวิธี RT-ddPCR เปรียบเทียบกับค่า Ct ที่ได้จาก real-time PCR

Sample code	Clinical sample type*	real-time RT-PCR (Ct)	RT-ddPCR** (Copies/reaction)
#1	saliva	Undetermined	0
#2	saliva	28.21	760
#3	saliva	Undetermined	9
#4	saliva	23.35	22,000
#5	NPS/NS	27.67	940
#6	NPS/NS	27.67	3,400
#7	NPS/NS	21.19	56,000
#8	NPS/NS	20.22	80,000
#9	NPS/NS	22.49	24,800
#10	NPS/NS	18.55	454,000
#11	NPS/NS	24.68	12,000
#12	NPS/NS	26.78	4,600
#13	NPS/NS	25.49	20,600
#14	NPS/NS	27.68	880
#15	NPS/NS	13.54	5,280,000
#16	NPS/NS	Undetermined	0
#17	NPS/NS	29.72	150
#18	NPS/NS	34.94	36
#19	NPS/NS	23.76	16,600
#20	NPS/NS	26.95	1,360
#21	NPS/NS	20.94	82,000

*NSP = *nasopharyngeal swab, NS = nasal swab, Ct = Cycle threshold

**เจือจางตัวอย่างที่มีค่า Ct ≥ 25 ที่ 1:1,000 ก่อนการทำ RT-ddPCR ค่าที่ได้เป็นค่าที่ปรับผลการเจือจางแล้ว

วิจารณ์

วิธี RT-ddPCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจปริมาณสารพันธุกรรม โดยสามารถระบุค่าปริมาณไวรัสในแต่ละตัวอย่างเป็นจำนวน copy ได้โดยไม่ต้องทำ standard curve นำไปใช้ตรวจตัวอย่างมาตรฐานหรือตัวอย่างอ้างอิงเพื่อใช้ประเมินคุณภาพวิธีตรวจทาง molecular technique ซึ่งไม่สามารถใช้ค่า plaque forming unit (PFU) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์สำหรับระบุปริมาณสารพันธุกรรมได้ เนื่องจากไวรัสที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ได้ต้องมีคุณสมบัติเพิ่มขยายจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยง (viability) ค่า PFU จึงมีค่าต่ำกว่าค่า copy ที่ได้จากการตรวจทาง molecular technique ซึ่งเป็นการตรวจวัดสารพันธุกรรมทั้งหมดในตัวอย่างทั้ง โดยรวมอนุภาคไวรัสที่ยังเพิ่มจำนวนได้ อนุภาคไวรัสที่มีสารพันธุกรรมแต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน (defective viral particle) และสารพันธุกรรมที่หลุดออกจากอนุภาคไวรัสที่แตก ในการศึกษาครั้งนี้ค่าปริมาณไวรัสจากเทคนิค RT-ddPCR คำนวณเป็นปริมาณไวรัสในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ได้เท่ากับ 5.54×10^6 copies/ml ซึ่งมากเป็น 55 เท่าของค่า PFU ที่ระบุไว้ (2×10^5 PFU/ml) วิธี RT-ddPCR ที่พัฒนามีช่วงการตรวจที่ยังเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 9–27,700 copies/reaction (เท่ากับ 1.8×10^3 – 5.5×10^6 copies/ml RNA sample) และมีค่าต่ำสุดของการตรวจวัดอยู่ที่ 4 copies/reaction (800 copies/ml RNA sample) เปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในจีน⁽¹⁴⁾ ซึ่งใช้ชุดน้ำยา COVID-19 digital PCR detection kit (TargetingOne (Corp. China) ตรวจยีน *ORF1ab* และ *N* ของ SARS-CoV-2 ที่พบว่ามีค่าการตรวจวัดปริมาณ SARS-CoV-2 อยู่ในช่วง 200–50,000 copies/reaction และมีค่าต่ำสุดของการตรวจวัดที่ 2.18 copies/reaction: ซึ่งค่าที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากการตรวจที่ใช้ชุดน้ำยาและยื่นเป้าหมายต่างกัน

ข้อจำกัดของวิธี RT-ddPCR คือ ในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสเข้มข้นมากจะทำให้ขั้นตอนในการเตรียม droplet มีสารพันธุกรรมเป้าหมายมากกว่า 1 copy อยู่ใน droplet เดียวกัน จึงเกิดการกระจายของสารพันธุกรรมเป้าหมายไม่เป็น Poisson distribution ค่าปริมาณที่ตรวจวัดได้จึงต่ำกว่าค่าจริง ดังนั้นหากทราบค่า Ct จากการทำ real-time RT-PCR ก่อนจะช่วยให้อัตราการการเจือจางตัวอย่าง RNA ก่อนการทำ RT-ddPCR จากการศึกษานี้มีข้อเสนอแนะว่า ถ้าค่า Ct น้อยกว่า 25 ควรเจือจางตัวอย่าง 1:1,000 ก่อนทำการตรวจวัดปริมาณ ส่วนในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณไวรัสต่ำมาก ค่าจำนวน copy ที่ตรวจวัดได้จะมีความแปรปรวนสูง เนื่องจากวิธี ddPCR เป็นวิธีที่ค่อนข้างใหม่น้ำยาที่ใช้ถูกผลิตจากบริษัทเดียวกับชุดเครื่องมือตรวจโดยเฉพาะน้ำยาชนิด one-step RT-PCR ที่มีน้ำยาจากผู้ผลิตอื่นจำกัด รวมทั้งขั้นตอนการตรวจที่ต้องการอุปกรณ์จำเพาะในการทำ partition ทำให้วิธี ddPCR มีค่าใช้จ่ายต่อปฏิกิริยาสูงกว่าวิธี real-time PCR ประมาณ 10 เท่า แต่ข้อดีของเทคนิคการตรวจคือไม่ต้องทำหลายซ้ำ (replicate) และไม่ต้องการ standard curve จึงทำให้ประหยัดกว่า

การทำ ddPCR มีการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายเช่นเดียวกับวิธีการตรวจด้วยหลักการ PCR ที่มีข้อควรระวังเรื่องการปนเปื้อนของ PCR product ในการทดสอบก่อนหน้า โดยต้องมีมาตรการป้องกันการปนเปื้อนที่รัดกุมเพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอม (false positive)

ปัจจัยรบกวนที่ส่งผลต่อความถูกต้องของค่าปริมาณไวรัสที่สำคัญคือตัวอย่างส่งตรวจ ในกรณีของ SARS-CoV-2 ที่ใช้ NPS/NP จุ่มใน viral transport medium (VTM) นั้น กระบวนการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งอาจจะ swab บริเวณที่มีเชื้อออกมาไม่เท่ากัน และกรณีที่เป็นตัวอย่างน้ำลาย จะไม่สามารถกำหนดปริมาตรน้ำลายที่เก็บได้ก่อนผสมกับ VTM ซึ่งแตกต่างกันจากการวัดค่าปริมาณไวรัสกลุ่มที่มีการขับไวรัสเข้าในกระแสเลือด เช่น human immune deficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV) และ hepatitis C virus (HCV) เป็นต้นที่สามารถกำหนดปริมาตรตัวอย่างพลาสมาเริ่มต้นก่อนสกัดสารพันธุกรรมได้แน่นอนกว่า ทำให้การตรวจวัดและ/หรือการเปรียบเทียบค่าปริมาณไวรัสในตัวอย่างที่เก็บต่างช่วงเวลาจากผู้ติดเชื้อรายเดียวกันมีค่าน่าเชื่อถือมากกว่า นอกจากนี้วิธีการสกัดสารพันธุกรรมก็เป็นปัจจัยในการทำให้เกิดความแปรปรวนในการสกัด ชุดสกัดสารพันธุกรรมแต่ละผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพในการสกัดสารพันธุกรรมและกำจัดตัวยับยั้ง (inhibitor) ของการทำ ddPCR ได้ต่างกัน ดังนั้นจึงควรทดสอบชุดสกัดก่อนและใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมจากบริษัทผู้ผลิตเดียวกันตลอดการศึกษาวิจัย

สรุป

การตรวจหาปริมาณ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค RT-ddPCR ที่ได้มีการศึกษาในครั้งนี้ สามารถตรวจหาไวรัสได้ต่ำสุดถึง 4 copies/reaction (800 copies/ml RNA sample) มีขั้นตอนการทำให้เป็น single-step RT-PCR และไม่ต้องใช้การเปรียบเทียบกับตัวอย่างมาตรฐานโดยการทำให้ standard curve จึงสะดวกและเหมาะสมในการตรวจหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างอ้างอิงเพื่อการประเมินคุณภาพชุดตรวจ/ห้องปฏิบัติการ และการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจทางโมเลกุล รวมทั้งการประยุกต์ใช้ตรวจหาปริมาณไวรัส SARS-CoV-2 เพื่อติดตามการรักษาคอนไซ COVID-19 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการอนุเคราะห์น้ำเลี้ยงเซลล์เพาะเชื้อ SARS-CoV และข้อมูลลำดับเบสของ RdRp primer และ probe

เอกสารอ้างอิง

1. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 2020; 395: 470-3.
2. WHO/2019-nCoV/Surveillance/v2020.1. Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV): interim guidance v1, January 2020. Geneva: World Health Organization; 2020.
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382(8): 727-33.
4. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181(2): 271-80.
5. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Muller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020; 581: 465-9.
6. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 30]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
7. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(16): 9236-41.
8. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods* 2013; 10(10): 1003-5.
9. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: a technology review. *Sensors (Basel)*. 2018; 18(4): 1271. (27 pages).

10. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin Chem* 2013; 59(6): 892-902.
 11. Pohl G, Shih IM. Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4(1): 41-7.
 12. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 2011; 83(22): 8604-10.
 13. Caviglia GP, Abate ML, Tandoi F, Ciancio A, Amoroso A, Salizzoni M, et al. Quantitation of HBV cccDNA in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: a new tool to detect occult infection. *J Hepatol* 2018; 69(2): 301-7.
 14. Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. *Clin Infect Dis* 2020; 71(15): 793-8.
-

Establishment of SARS-CoV-2 Quantification by Reverse Transcription Droplet Digital PCR

**Nuanjun Wichukchinda Natthakul Bunnueang Wimala Inunchot Waritta Sawaengdee
and Surakameth Maharisimongkol**

*Division of Genomics Medicine and Innovation Support, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road,
Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT Pandemic of SARS-CoV-2 affects global health, social, and economic system. Research and development in sciences and medicine involving diagnosis, therapy, and vaccine has been intensively focused to control this contagious virus. Quantification of SARS-CoV-2 viral load is important for studying pathology and monitoring treated patients, and also for standard RNA preparation. Quantitative real-time PCR technique has low accuracy, high variability, and required standard calibration in every run. Here, we reported the development of reverse-transcription droplet digital PCR (RT-ddPCR) method for SAR-CoV-2 detection which can absolutely quantitate the virus by detecting *RNA dependent RNA polymerase (RdRp)* gene as low as 800 copies/ml with linearity of detection at 1.8×10^3 to 5.54×10^6 copies/ml of RNA sample. This method can be applied to measure SARS-CoV-2 in both reference RNA and clinical samples. Further improvement in quality of biological samples in term of collection method and preservation will support the accuracy of the viral load assay.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, quantification, RT-ddPCR