การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสซิกา

สุมาลี ชะนะมา[1] ภัทร วงษ์เจริญ[1] ศิริรัตน์ แนมขุนทด[1] ลัดดาวัลย์ มีแผนดี[1] อริสรา โปษณเจริญ[1] พงศ์ศิริ ตาลทอง[1] ฮุสนียะห์ วาเต๊ะ[1] สาริณี ชำนาญรักษา[1] วรารัตน์ แจ่มฟ้า[1] และอารีรัตน์ สง่าแสง[2]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

[2]นักวิชาการอิสระ 690/25 ตำบลบางกระสอ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ไวรัสซิกา (Zika virus; ZIKV) เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มฟลาวิไวรัส (Flaviviridae family) มียุงลายบ้านและยุงลายสวนเป็นพาหะนำโรค และมีช่องทางติดเชื้อทางอื่นที่พบได้น้อย คือ จากแม่สู่ลูก ทางเพศสัมพันธ์ และการให้เลือด ลักษณะอาการทั่วไป คือ มีไข้ ออกผื่น ปวดข้อ และตาแดง การติดเชื้อไวรัสซิการะหว่างตั้งครรภ์อาจทำให้ทารกแรกเกิดศีรษะเล็กผิดปกติ วิธีที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสซิกา คือ การตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาจากตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะโดยวิธี real-time RT-PCR วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธี real-time RT-PCR และผลิตไวรัสซิกาอาร์เอ็นเอเพื่อใช้เป็นสารควบคุม การทดสอบ ZIKV real-time RT-PCR นี้ ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา (US-CDC) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ จำนวน 3 ชุด ที่จำเพาะต่อยีน prM, E และ NS2b การผลิตและสังเคราะห์ไวรัสซิกาอาร์เอ็นเอสารควบคุมขนาดความยาว 350 bp ที่เป็นนิวคลีโอไทด์ของยีน prM และ E ใช้เทคนิค *In vitro* transcription (IVT) จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโดยการตรวจหาอาร์เอ็นเอสารควบคุม และเชื้อไวรัสซิกาที่เจือจางความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีความจำเพาะร้อยละ 100 มีค่า Limit of Detection เท่ากับ 0.15 PFU/ml นอกจากนี้การทดสอบความชำนาญพบว่ามีความสอดคล้องกันร้อยละ 100 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการทดสอบหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วย real-time RT-PCR สามารถตรวจหาไวรัสซิกาสายพันธุ์เอเชียและแอฟริกาได้

คำสำคัญ : ไวรัสซิกา, *In vitro* transcription (IVT), real-time RT-PCR

Corresponding author E-mail: sumalee.c@dmsc.mail.go.th

Received: 6 March 2021 *Revised: 17 May 2021* *Accepted: 27 May 2021*

บทนำ

ไวรัสซิกา (Zika virus; ZIKV) เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มฟลาวิไวรัส (Flaviviridae family) เช่นเดียวกับไวรัสเดงกี (Dengue virus; DENV) ไวรัสเจอี (Japanese encephalitis virus; JEV) และไวรัสเวสต์ไนล์ (West Nile virus; WNV) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอความยาว 10,794 base pairs (bp) ตัวเชื้อแบ่งเป็น 2 สายพันธุ์ คือ เอเชีย (Asia) และแอฟริกา (Africa) สำหรับประเทศไทย พบว่าเป็นสายพันธุ์เอเชีย[1] มียุงลายเป็นพาหะนำโรค และมีช่องทางติดเชื้อทางอื่นที่พบได้น้อย คือ ทางเพศสัมพันธ์ การให้เลือด และจากแม่สู่ลูก ระยะฟักตัวในคน 4 ถึง 7 วัน เมื่อปี พ.ศ. 2490 มีการเพาะเชื้อไวรัสซิกาครั้งแรกได้จากลิงในป่าซิกา ประเทศยูกันดา และมีรายงานแยกเชื้อไวรัสซิกาได้จากคนที่ประเทศไนจีเรียในปี พ.ศ. 2511[2] ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ ส่วนน้อยมีไข้ ออกผื่น ตาแดง และปวดข้อ ที่สำคัญมีหลักฐานแสดงความสัมพันธ์กับทารกแรกเกิดศีรษะเล็ก (microcephaly) กรณีที่เกิดการระบาดใหญ่ของการติดเชื้อไวรัสซิกาที่ประเทศบราซิลในปี พ.ศ. 2558 ซึ่งพบการเกิดกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะศีรษะเล็กแต่กำเนิด และผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบประสาทเพิ่มขึ้น[3] ทำให้องค์การอนามัยโลกประกาศภาวะฉุกเฉินด้านสาธารณสุขระหว่างประเทศ มีคำเตือนนักท่องเที่ยว รวมทั้งหญิงวัยเจริญพันธุ์ในการเดินทางไปในพื้นที่ระบาด สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบผู้ติดเชื้อไวรัสซิกาครั้งแรกในปี พ.ศ. 2556[4] เป็นนักท่องเที่ยวต่างชาติ 2 ราย เดินทางมากรุงเทพฯ และภูเก็ตในช่วงปลายปี พ.ศ. 2555 หลังจากนั้นกรมควบคุมโรคได้ทำการสอบสวนโรคย้อนหลังระหว่างปี พ.ศ. 2555-2558 พบผู้ป่วยยืนยันเฉลี่ยปีละ 5 ราย[5, 6] ต่อมาในเดือนมกราคมและพฤษภาคม พ.ศ. 2559 มีชายไทยจังหวัดอุดรธานีถูกกักตัวที่สนามบินนานาชาติเถาหยวน กรุงไทเป ไต้หวัน เนื่องจากมีไข้และตรวจพบว่าติดเชื้อไวรัสซิกา จำนวน 2 คน[7, 8] ในวันที่ 3 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 กระทรวงสาธารณสุขไทยได้ประกาศเพิ่มชื่อโรคติดเชื้อไวรัสซิกา (ในระยะแรกเรียกว่าโรคไข้ซิกา) เป็นโรคที่ต้องแจ้งความตาม พ.ร.บ.โรคติดต่อ[9] โดยกรมควบคุมโรคกำหนดนิยามการเฝ้าระวังโรคไข้ซิกาดังนี้ ผู้ป่วยสงสัย หมายถึง ผู้ป่วยมีไข้ และมีอาการอย่างน้อย 2 ใน 3 อาการ ดังต่อไปนี้ 1) ออกผื่น 2) ปวดข้อ 3) ตาแดง และผลการตรวจไวรัสเดงกี ไวรัสหัด และไวรัสชิคุนกุนยาให้ผลลบ ผู้ป่วยยืนยัน หมายถึง ผู้ป่วยสงสัยและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการยืนยันพบเชื้อไวรัสซิกาในเลือด หรือตรวจพบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อไวรัสซิกา[2] นายแพทย์สาธารณสุขจังหวัดต้องดำเนินการตามขั้นตอนที่ระบุในมาตรการควบคุมโรคกรณีพบผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสซิกา ฉบับวันที่ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสซิกา จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่ต้องดำเนินการ ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นส่วนสำคัญในการบ่งชี้ผู้ติดเชื้อในพื้นที่เป้าหมายเพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคไม่ให้แพร่กระจายจนเกิดเป็นโรคระบาด เพราะหากเกิดการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศจะส่งผลกระทบต่อธุรกิจการท่องเที่ยว และการส่งสินค้าบริโภคออกไปขายต่างประเทศ

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาทางห้องปฏิบัติการ ใช้วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาเป็นหลัก และวิธีอื่น เช่น การตรวจแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะต่อไวรัสซิกาด้วยวิธี ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ส่วนใหญ่พบปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) กับไวรัสอื่นๆ ในกลุ่มฟลาวิไวรัส เช่น ไวรัสเดงกี ไวรัสไข้เหลือง ไวรัสเจอี[10] การตรวจนิวทรัลไลซิ่งแอนติบอดีด้วยวิธีพลาครีดัคชั่นนิวทรัลไลเซชั่น (Plaque Reduction Neutralization Test; PRNT) พบว่าให้ผลจำเพาะมากกว่าการตรวจ IgM วิธี ELISA แต่มีขั้นตอนซับซ้อนมากกว่า[11] การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR สามารถตรวจพบได้ถึงวันที่ 10 หลังเริ่มป่วย โดยใช้หลักการ One-step RT-PCR หรือ real-time RT-PCR (real-time reverse transcription-polymerase chain reaction) จากบทความของ Faye O และคณะ[12] ได้นำเสนอการตรวจไวรัสซิกาด้วยวิธี One-step RT-PCR พบว่ามีความไวและจำเพาะต่อไวรัสซิกา มีค่า Limit of detection เท่ากับ 7.1 PFU/reaction ในปี พ.ศ. 2550 Lanciotti RS และคณะ[13] ได้เผยแพร่บทความเกี่ยวกับคุณสมบัติทางพันธุกรรมและภูมิคุ้มกันวิทยาของเชื้อไวรัสซิกาที่ระบาดในประเทศไมโครนีเซีย (Micronesia) และเป็นนักวิทยาศาสตร์คณะแรกที่นำเสนอวิธีตรวจไวรัสซิกาด้วยวิธี

real-time RT-PCR รวมทั้งแสดงผลวิเคราะห์ลำดับเบสของตัวเชื้อ ต่อมาพบว่าการตรวจวิธี real-time RT-PCR เป็นการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาที่น่าเชื่อถือและมีความไวสูง[14, 15, 16, 17, 18]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจโรคติดเชื้อไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR รวมทั้งตรวจสอบความถูกต้องของวิธี และผลิตอาร์เอ็นเอสารควบคุม (RNA control) โดยวิธี *In Vitro* Transcription เพื่อใช้เป็นสารควบคุมบวก (positive control)

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมไพรเมอร์และโพรบ

ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 3 ชุด สังเคราะห์โดย บริษัท ธีระเทรดดิ้ง จำกัด ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะต่อยีนส่วน prM, E และ NS2b ของไวรัสซิกา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาโดยวิธี real-time RT-PCR

ชุดที่	ชื่อไพรเมอร์/โพรบ	ลำดับเบส 5'--3'	ตำแหน่ง*	ยีน
1	ZIKV 835	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835-857	prM
	ZIKV 911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911-890	
	ZIKV 860-FAM	CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG	860-886	
2	ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102	E
	ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162-1139	
	ZIKV 1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	1107-1137	
3	ZIKV 4481	CTGTGGCATGAACCCAATAG	4434-4453	NS2b
	ZIKV 4552c	ATCCCATAGAGCACCACTCC	4524-4505	
	ZIKV 4507c-FAM	CCACGCTCCAGCTGCAAAGG	4479-4460	

*ตำแหน่งของยีนเป้าหมายของไวรัสซิกาสายพันธุ์ MR766 (GenBank accession number AY632535)

การเตรียมอาร์เอ็นเอสารควบคุม

ดีเอ็นเอสังเคราะห์จาก บริษัท กิบไทย จำกัด มีลำดับเบสของสารพันธุกรรมไวรัสซิกา อ้างอิงลำดับเบสของ GenBank accession number EU545988 ตำแหน่งที่ 821 ถึง 1170 รวมความยาว 350 bp นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยผสมดีเอ็นเอสังเคราะห์ 3 ไมโครลิตร กับ 10× Buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM $MgCl_2$ 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM ZIKV 835 IVT Primer (TAATACGACTCACTATAGGGTTG-GTCATGATACTGCTGATTGC) 1.5 ไมโครลิตร, 10 μM ZIKV1162c Primer 1.5 ไมโครลิตร, Immolase DNA polymerase enzyme 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจาก RNase 14.9 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม C1000™ Cycler (BIORAD, USA) ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95°C 10 นาที และ 40 รอบ ของ 95°C 30 วินาที, 60°C 30 วินาที, 72°C 30 วินาที และ 1 รอบ ของ 72°C 5 นาที จากนั้นสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ แล้วทำการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยวิธี *In vitro* transcription ด้วยชุดน้ำยา *In vitro* transcription Maxiscript kit (Ambion Inc., USA) และทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ NucAway column (Ambion Inc., USA) วัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., DE, USA) แบ่งบรรจุและเก็บรักษาอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -70°C ใช้เป็นสารควบคุมบวก

ไวรัสซิกามาตรฐาน

ไวรัสซิกามาตรฐาน จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (AFRIMS) คือ สายพันธุ์ MR766 เป็นสายพันธุ์แอฟริกา มีความแรง 2.5×10^7 PFU/ml และสายพันธุ์ SV0127/14SV เป็นสายพันธุ์เอเชีย ซึ่งเพาะแยกเชื้อได้จากคนไทย มีความแรง 1.5×10^5 PFU/ml หลังจากนั้นทำการเจือจางไวรัสซิกาสายพันธุ์ SV0127/14SV ด้วยซีรัมและปัสสาวะ โดยทำการเจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} เพื่อนำไปทดสอบ

การตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาวิธี real-time RT-PCR

การตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR ดัดแปลงมาจากวิธีของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา (US-CDC) ซึ่งอ้างอิงวิธีของ Lanciotti RS และคณะ[13] ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2559 ตรวจหาโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 และ 2 ซึ่งจำเพาะต่อยีน prM และ E ตัวอย่างตรวจคืออาร์เอ็นเอสารควบคุม ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559 เริ่มตรวจหาโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และ 3 ซึ่งจำเพาะต่อยีน E และ NS2b ตัวอย่างตรว คือ ไวรัสมาตรฐานสายพันธุ์ MR766 และสายพันธุ์ SV0127/14SV นำตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วยชุดสกัด QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN, Germany) ได้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 40 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำยาของชุด QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany) ดังนี้ 2 × Ready Mix 12.5 ไมโครลิตร, Enzyme mix 0.25 ไมโครลิตร, 100 μM ไพรเมอร์ 2 ชนิด ของชุดที่ 1 หรือชุดที่ 2 หรือชุดที่ 3 ชนิดละ 0.25 ไมโครลิตร, 25 μM โพรบของชุดที่ 1 หรือชุดที่ 2 หรือชุดที่ 3 ปริมาตร 0.15 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจาก RNase 1.6 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง ABI7500 (Applied Biosystems, USA) ตั้งโปรแกรมดังนี้ 50°C 30 นาที, 95°C 15 นาที และ 45 รอบ ของ 95°C 15 วินาที และ 60°C 60 วินาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการวิเคราะห์ผลบวกเมื่อพบ amplification curve ลักษณะ S-curve ชัดเจน และเครื่องแสดงค่า Cycle threshold (Ct) น้อยกว่า 40 และผลลบเมื่อไม่พบ amplification curve หรือเครื่องไม่แสดงค่า Ct หรือมี amplification curve ไม่เป็น S-curve หรือได้ค่า Ct มากกว่าหรือเท่ากับ 40

การสรุปผลตรวจของตัวอย่าง

ทำการตรวจตัวอย่างด้วยไพรเมอร์และโพรบ จำนวน 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 หรือชุดที่ 2 และชุดที่ 3 โดยสรุปเป็นผลบวกเมื่อพบผลบวกของไพรเมอร์และโพรบอย่างน้อย จำนวน 1 ชุด

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ทำการหาความจำเพาะของการตรวจตัวอย่างไวรัสในกลุ่มฟลาวิไวรัส 6 ชนิด จำนวน 10 ตัวอย่าง คือ ไวรัสเดงกี 1, 2, 3 และ 4 ชนิดละ 1 ตัวอย่าง ไวรัสเจอี และไวรัสเวสต์ไนล์ ชนิดละ 3 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่เจือจาง, เจือจาง 10 เท่า และ 100 เท่า ทำการทดลองตัวอย่างละครั้ง

Limit of Detection ของการตรวจไวรัสซิกามาตรฐานสายพันธุ์ SV0127/14SV ปริมาณ 1.5×10^5 PFU/ml นำมาเจือจางด้วยซีรัมและปัสสาวะที่ความเข้มข้น 10 เท่า ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6}

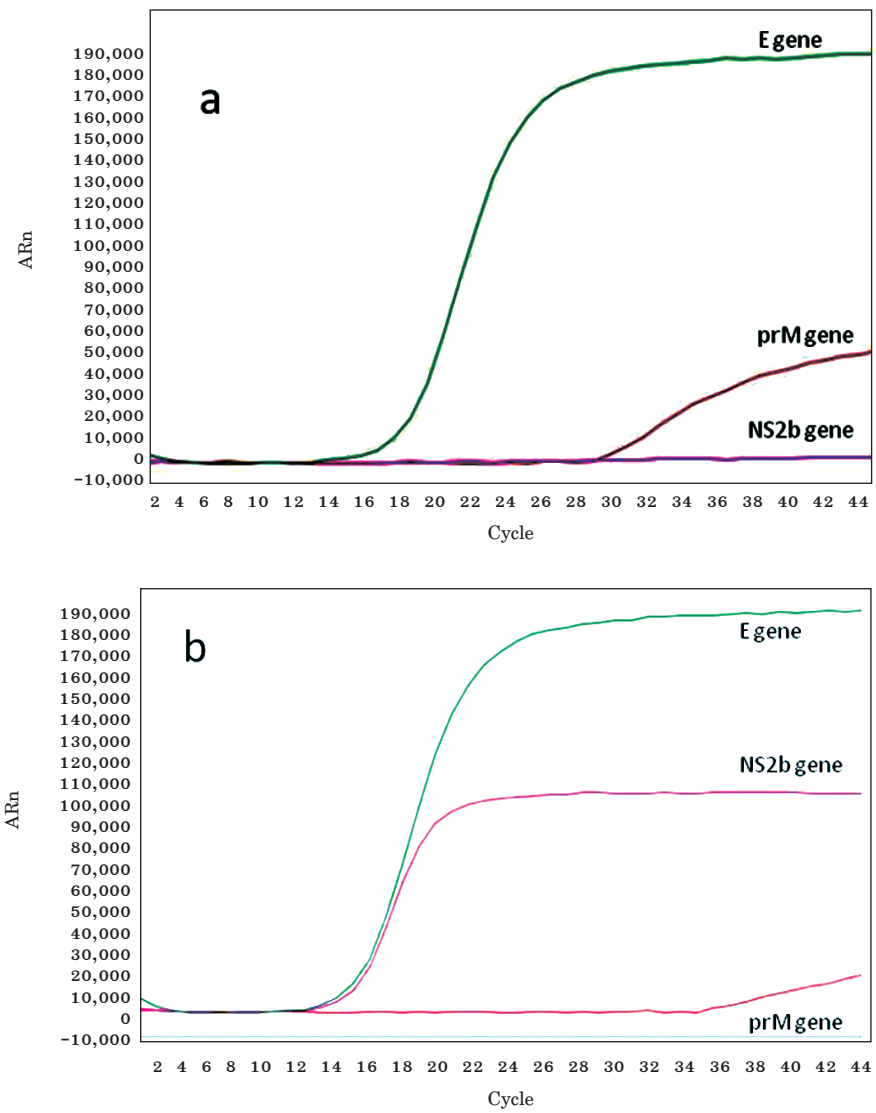
การทดสอบความชำนาญ

หน่วยงานที่เข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญการตรวจหาไวรัสซิกามี 2 หน่วยงาน คือ ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา และสถาบัน Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) ทำการทดสอบความชำนาญโดยดำเนินการตรวจตัวอย่าง จำนวน 10 และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตัวอย่างทดสอบความชำนาญของศูนย์ควบคุม

โรคติดต่อสหรัฐอเมริกา เป็นตัวอย่างซีรัมคนปกติที่ผสมไวรัสซิกาที่ความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-6} ตรวจโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ตัวอย่างทดสอบความชำนาญของสถาบัน QCMD เป็นตัวอย่างซีรัมคนปกติที่ผสมไวรัสซิกา ไวรัสเดงกี ไวรัสเวสต์ไนล์ และไวรัสไข้เหลือง ตรวจโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และชุดที่ 3

ผล

การตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาจากตัวอย่างด้วยวิธี real-time RT-PCR ที่ดัดแปลงจากวิธีของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา (US-CDC) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 (prM gene), ชุดที่ 2 (E gene) และชุดที่ 3 (NS2b gene) ผลการตรวจไวรัสซิกาสายพันธุ์ MR766 ดังแสดงในภาพที่ 1a และผลการตรวจไวรัสซิกาสายพันธุ์ SV0127/14SV ในภาพที่ 1b พบว่าไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 แสดงกราฟที่มีความชันต่ำและไม่มีลักษณะเป็น S-curve ทั้งสองสายพันธุ์ แตกต่างจากไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 แสดงกราฟที่มีความชันสูงและเป็น S-curve ทั้งสองสายพันธุ์ สำหรับไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 3 แสดงกราฟลักษณะ S-curve เฉพาะสายพันธุ์ SV0127/14SV และไม่สามารถตรวจสายพันธุ์ MR766 ได้



ภาพที่ 1 ผลตรวจสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 (prM gene), ชุดที่ 2 (E gene) และชุดที่ 3 (NS2b gene): (a) ผลตรวจไวรัสซิกาสายพันธุ์ MR766, (b) ผลตรวจไวรัสซิกาสายพันธุ์ SV0127/14SV

การผลิตอาร์เอ็นเอสารควบคุมโดยเทคนิค *In vitro* transcription (IVT) ได้ผลผลิตเป็นอาร์เอ็นเอที่มีสารพันธุกรรมไวรัสซิกาความยาว 350 bp ปริมาณรวม 9,640 นาโนกรัม ความเข้มข้นเริ่มต้น 25.8 ng/µl นำมาเจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} แล้วนำมาตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR พบว่าให้ผลบวกทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR ของอาร์เอ็นเอสารควบคุม โดยแสดงค่า Cycle threshold (Ct) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น	ค่า Ct (ไพรเมอร์และโพรบ)	
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
อาร์เอ็นเอสารควบคุม	ไม่เจือจาง	17.1	17.3
ความเข้มข้น 25.8 ng/µl	10^{-1}	20.8	21.2
	10^{-2}	24.2	24.7
	10^{-3}	27.8	28.3
	10^{-4}	30.7	31.7
	10^{-5}	33.6	34.2
	10^{-6}	36.9	37.8

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจหาฟลาวิไวรัสชนิดอื่น ๆ รวม 6 ชนิด จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าได้ผลลบทั้งหมดคิดเป็นความจำเพาะร้อยละ 100 จากผลตรวจไวรัสซิกาสายพันธุ์มาตรฐาน MR766 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไทยหมายเลข SV0127/14 ที่นำมาเจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ให้ผลบวกทั้งหมด 6 ความเข้มข้น คิดเป็นค่า Limit of Detection เท่ากับ 0.15 PFU/ml ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR ของไวรัสซิกามาตรฐาน โดยแสดงค่า Cycle threshold (Ct) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น	ค่า Ct (ไพรเมอร์และโพรบ)	
		ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
ไวรัสซิกาสายพันธุ์ SV0127/14SV 1.5×10^5 PFU/ml เจือจางด้วยซีรัม	10^{-1}	20.5	20.2
	10^{-2}	24.6	24.5
	10^{-3}	27.4	27.0
	10^{-4}	30.8	30.4
	10^{-5}	34.2	34.0
	10^{-6}	37.2	36.9
ไวรัสซิกาสายพันธุ์ SV0127/14SV 1.5×10^5 PFU/ml เจือจางด้วยปัสสาวะ	10^{-1}	22.1	21.4
	10^{-2}	26.8	26.6
	10^{-3}	31.2	30.9
	10^{-4}	33.1	33.0
	10^{-5}	36.4	35.4
	10^{-6}	39.1	39.1

จากผลการเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญกับศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา โดยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 และชุดที่ 2 พบว่าให้ผลถูกต้องสอดคล้องกันทั้ง 10 ตัวอย่าง และผลการตรวจตัวอย่างทดสอบความชำนาญของสถาบัน QCMD โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และชุดที่ 3 พบว่าให้ผลถูกต้องสอดคล้องกันทั้ง 8 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบความชำนาญการตรวจไวรัสซิกาของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกาและสถาบัน QCMD

ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา					
หมายเลข	**ชนิดตัวอย่าง**	**ค่าเป้าหมาย**	**ค่า Ct (ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1)**	**ค่า Ct (ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2)**	**สรุปผล**
PT01	Zika 10^{-2}	Positive	19.90	22.80	Positive
PT02	Zika 10^{-5}	Positive	30.70	34.00	Positive
PT03	Zika 10^{-4}	Positive	26.90	29.80	Positive
PT04	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
PT05	Zika 10^{-3}	Positive	24.90	26.60	Positive
PT06	Zika 10^{-4}	Positive	27.70	30.20	Positive
PT07	Zika 10^{-3}	Positive	25.10	24.90	Positive
PT08	Zika 10^{-5}	Positive	34.80	34.10	Positive
PT09	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
PT10	Zika 10^{-6}	Positive	36.0	35.00	Positive
สถาบัน QCMD					
หมายเลข	**ชนิดตัวอย่าง**	**ค่าเป้าหมาย**	**ค่า Ct (ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2)**	**ค่า Ct (ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 3)**	**สรุปผล**
ZIKA17S-01	Zika (French Polynesian)	Positive	37.5	Negative	Positive
ZIKA17S-02	D2, WNV, YF	Negative	Negative	Negative	Negative
ZIKA17S-03	Zika (African)	Positive	37.4	Negative	Positive
ZIKA17S-04	Zika (French Polynesian)	Positive	32.9	32.3	Positive
ZIKA17S-05	Zika (French Polynesian)	Positive	30.0	29.5	Positive
ZIKA17S-06	Zika (African)	Positive	35.2	Negative	Positive
ZIKA17S-07	Zika (African)	Positive	33.0	Negative	Positive
ZIKA17S-08	Negative	Negative	N/A	N/A	Negative

วิจารณ์

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยดัดแปลงจากวิธีของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา มีการใช้ไพรเมอร์และโพรบทั้งหมดจำนวน 3 ชุด ที่จำเพาะต่อยีน prM, E และ NS2b นั้น พบว่าชุดที่ 1 จำเพาะต่อไวรัสซิกาสายพันธุ์แอฟริกา ชุดที่ 2 จำเพาะต่อไวรัสซิกาสายพันธุ์แอฟริกาและเอเชีย ชุดที่ 3 จำเพาะต่อไวรัสซิกาสายพันธุ์เอเชีย การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์และโพรบ 2 ชุด เพื่อตรวจ 2 ยีนที่ต่างกัน พบว่าไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ใช้ตรวจได้ผลดีกว่าชุดที่ 1 และชุดที่ 2 จากผลการแสดงของกราฟสูงชันชัดเจน กราฟที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 ส่วนใหญ่จะแสดงผลการเกิดความชันของกราฟต่ำตั้งแต่รอบที่ 38-40 ซึ่งเป็น nonspecific result จึงตัดสินเป็นผลลบ และในรายที่พบผลบวกเส้นกราฟมีรอยหยักไม่คมชัดเหมือนชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาวิจัยของ Cherrel R และคณะ[10] และ Corman VM และคณะ[18] ในการตรวจหาไวรัสซิกา Pan American Health Organization (PAHO) ได้เสนอแนะให้ใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 3 ซึ่งตรวจจับยีน NS2b[17] และพบว่าสามารถตรวจไวรัสซิกาสายพันธุ์เอเชียได้ดีกว่าชุดที่ 1 ดังนั้นศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา จึงเปลี่ยนวิธีตรวจโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ที่จำเพาะต่อยีน E และ NS2b และเปลี่ยนชื่อไพรเมอร์และโพรบจาก ZIKA1086/1162c/1107-FAM เป็น ZIKA1087/1163c/1108-FAM[19] ซึ่งผู้วิจัยและคณะได้ทดลองใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และชุดที่ 3 นี้ แล้วพบว่าตรวจไวรัสซิกาสายพันธุ์ SV0127/14SV ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไทยได้ผลดี ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จากการตรวจหาไวรัสซิกาสายพันธุ์ SV0127/14SV เจือจางด้วยซีรัม 10^{-1} ถึง 10^{-6} คำนวณค่า detection limit ได้เท่ากับ 0.15 PFU/ml ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการเจือจางไวรัสมากกว่า 10^{-6} จากตารางที่ 3 ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสเจือจางด้วยซีรัมที่ 10^{-6} ได้ค่า Ct 37.2 (ชุดที่ 2) และ 36.9 (ชุดที่ 3) ตามหลักการความเข้มข้นของเชื้อไวรัสต่างกัน 10 เท่า จะได้ค่า Ct ต่างกันประมาณ 3 ถ้าเพิ่มความเจือจางเป็น 10^{-7} และ 10^{-8} น่าจะได้ค่า Ct 40.2 และ 43.2 ตามลำดับ ซึ่งค่า Ct มากกว่า 40 จะตัดสินเป็นผลลบ เป็นที่สังเกตว่าสารเจือจางไวรัสชนิดปัสสาวะมีผลให้ค่า Ct สูงขึ้นประมาณ 2 รอบเมื่อเปรียบเทียบกับสารเจือจางชนิดซีรัม อาจเป็นเพราะสภาวะในปัสสาวะ เช่น ความเป็นกรดด่าง ปริมาณโปรตีนไม่เหมาะสมที่จะใช้รักษาสภาพไวรัส เป็นต้น ผลการวิเคราะห์ความจำเพาะโดยตรวจเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่ไม่ใช่ไวรัสซิกา จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลลบทั้งหมด คำนวณความจำเพาะได้ร้อยละ 100 การศึกษานี้ไม่ได้คำนวณร้อยละความไว และความจำเพาะจากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยจริงเนื่องจากโรคติดเชื้อไวรัสซิกาเป็นโรคใหม่ ยังไม่มีตัวอย่างผู้ป่วยจริงจากหน่วยงานใดนำมาใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบได้ รายงานการศึกษาวิจัยของ Corman VM และคณะ [18] ได้ผลิตสารควบคุมชนิด universal control ribonucleic acid (uncRNA) ประกอบด้วย ยีนเป้าหมายของไวรัสซิกาบนสายอาร์เอ็นเอเดียวกัน และใช้ประเมินประสิทธิภาพวิธีตรวจสารพันธุกรรมไวรัสซิกาวิธี real-time RT-PCR รวม 9 วิธี พบค่า detection limit อยู่ระหว่าง 2.1 ถึง 1373.3 uncRNA copies/reaction ซึ่งวิธีที่ใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ตรงกับการศึกษานี้แสดงค่า 4.1 และ 17.0 uncRNA copies/reaction ตามลำดับ

ผลการทดสอบความชำนาญของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา เป็นการตรวจด้วยไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ได้ผลตรงค่าเป้าหมาย จำนวน 10 ตัวอย่าง ในการทดสอบครั้งนี้ไม่ทราบรายละเอียดของสายพันธุ์ไวรัสที่ใช้ผลิตตัวอย่าง ในขณะที่ผลทดสอบความชำนาญของสถาบัน QCMD ด้วยไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และชุดที่ 3 พบว่าวิธีตรวจสามารถตรวจไวรัสซิกา 2 สายพันธุ์ ได้แตกต่างกัน และไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสเดงกี ไวรัสเวสต์ไนล์ และไวรัสไข้เหลือง

คณะผู้วิจัยได้ถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR ให้กับบุคลากรของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 14 แห่ง ในการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสวิทยาทางการแพทย์ ระหว่างวันที่ 27-29 มิถุนายน พ.ศ. 2559 ณ ห้องประชุม 628 อาคาร 10 ชั้น 6 และห้องปฏิบัติการ

อาคาร 1 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลังจากนั้นได้จัดส่งชุดไพรเมอร์ โพรบ สารควบคุมบวก และวัตถุทดสอบความชำนาญ ให้บุคลากรนำไปพัฒนาวิธีตรวจที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยห้องปฏิบัติการทั้ง 14 แห่ง ตอบผลตรวจวิเคราะห์วัตถุทดสอบความชำนาญได้ถูกต้องครบทั้ง 5 ตัวอย่าง และเริ่มให้บริการตรวจที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2559

สรุป

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยดัดแปลงจากวิธีการตรวจของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา ทำการตรวจหา 2 ยีน คือ E และ NS2b พบว่าเป็นวิธีที่มีความจำเพาะร้อยละ 100 มีค่า Limit of Detection เท่ากับ 0.15 PFU/ml ซึ่งทางห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 14 แห่ง ได้ดำเนินการให้บริการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real-time RT-PCR เป็นงานประจำตั้งแต่ พ.ศ. 2559 และการผลิตอาร์เอ็นเอสารควบคุมโดยวิธี *In Vitro* Transcription ได้ผลผลิตเป็นอาร์เอ็นเอที่มีสารพันธุกรรมไวรัสซิกา สามารถใช้เป็นสารควบคุมบวกสำหรับการพัฒนาวิธีตรวจเชื้อในช่วงเวลาที่ไม่มีเชื้อไวรัสซิกามาตรฐาน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินงบประมาณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ประจำปี พ.ศ. 2559-2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร โดย Dr. Louis R Macareo ที่ให้ความอนุเคราะห์ไวรัสซิกา จำนวน 2 สายพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

1. Ellison DW, Ladner JT, Buathong R, Alera MT, Wiley MR, Hermann L, et al. Complete genome sequences of Zika virus strains isolated from the blood of patients in Thailand in 2014 and the Philippines in 2012. Genome Announc 2016; 4(3): e00359-16. (2 pages).
2. Hayes EB. Zika virus outside Africa. Emerg Infect Dis 2009; 15(9): 1347-50.
3. Kleber de Oliveira W, Cortez-Escalante J, De Oliveira WT, do Carmo GM, Henriques CM, Coelho GE, et al. Increase in reported prevalence of microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed Zika virus transmission during the first trimester of pregnancy-Brazil, 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2016; 65(9): 242-7.
4. Buathong R, Hermann L, Thaisomboonsuk B, Rutvisuttinunt W, Klungthong C, Chinnawirotpisan P, et al. Detection of Zika virus infection in Thailand, 2012-2014. Am J Trop Med Hyg 2015; 93(2): 380-3.
5. วิรุฬห์ พรพัฒน์กุล. โรคติดเชื้อไวรัสซิกาและสถานการณ์โรคในจังหวัดนนทบุรี. ว. สมาคมเวชศาสตร์ป้องกันแห่งประเทศไทย 2560; 7(2): 244-50.
6. กรมควบคุมโรคเผยประเทศไทยเฝ้าระวังสถานการณ์โรคติดเชื้อไวรัสซิกาอย่างต่อเนื่อง พร้อมใช้มาตรการป้องกันและควบคุมโรคระดับสูงสุดในพื้นที่ทันทีที่พบผู้ป่วย. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำเดือน [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 12 เม.ย. 2564]; 1(6): [18 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.ato.moph.go.th/sites/default/files/monthly_0859.doc.

7. Huang AS, Shu PY, Yang CH. A new reportable disease is born: Taiwan Centers for Disease Control's response to emerging Zika virus infection. J Formos Med Assoc 2016; 115(4): 223-5.
8. Duong V, Dussart P, Buchy P. Zika virus in Asia. Int J Infect Dis 2017; 54: 121-8.
9. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เพิ่มเติมชื่อโรคติดต่อต้องแจ้งความ. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 35 ง (วันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2559). หน้า 3.
10. Charrel RN, Leparc-Goffart I, Pas S, de Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. Bull World Health Organ 2016; 94(8): 574-84.
11. World Health Organization. Laboratory testing for Zika virus infection, interim guidance. [online]. 2016; [cited 2021 Apr 12]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/csr/resources/publications/zika/laboratory-testing/en.
12. Faye O, Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Sall AA. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. J Clin Virol 2008; 43(1): 96-101.
13. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serological properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis 2008; 14(8): 1232-9.
14. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. Virol J 2013; 10: 311. (8 pages).
15. Pyke AT, Daly MT, Cameron JN, Moore PR, Taylor CT, Hewitson GR, et al. Imported Zika virus infection from the Cook Islands into Australia, 2014. PLos Curr 2014; 6: (7 pages).
16. Tappe D, Nachtigall A, Kapaun A, Schnitzler P, Gunther S, Schmidt-Chanasit J. Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014. Emerg Infect Dis 2015; 21(5): 911-3.
17. Waggoner JJ, Pinsky BA. Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. J Clin Microbiol 2016; 54(4): 860-7.
18. Corman VM, Rasche A, Baronti C, Aldabbagh S, Cadar D, Reusken CB, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. Bull World Health Organ 2016; 94(12): 879-92.
19. Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-Larson L, Stanek D, Blackmore C, et al. Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated Zika virus diseases - Florida, 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2016; 65(18): 475-8.

Development and Validation of Method for Zika Virus Detection

Sumalee Chanama[1] Pattara Wongjaroen[1] Sirirat Naemkhunthot[1] Laddawan Meephaendee[1] Arisara Posanacharoen[1] Pongsiri Tanthong[1] Husneeyah Vateh[1] Sarinee Chumnanraksa[1] Wararat Jamfa[1] and Areerat Sa-ngasang[2]

[1]*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000*

[2]*Retired Government Official, 690/25 Bang Kraso, Mueang, Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT Zika virus (ZIKV), member of the Flaviviridae family, is spread mostly by the bite of an infected *Aedes aegypti* or *Ae. albopictus* and can be passed from mother to fetus, sexual transmission and blood transfusion. The most common symptoms are fever, rash, joint pain and red eyes. ZIKV infection during pregnancy can cause microcephaly. The most appropriate ZIKV assay is the detection of ZIKV RNA in serum and urine by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real time RT-PCR). The objectives of this study were the development and validation of ZIKV real-time RT-PCR, and also the production of ZIKV RNA control. ZIKV real-time RT-PCR test was modified from US-CDC's protocol, using 3 sets of primer/probe specific to prM, E and NS2b genes. ZIKV RNA control containing 350 base pairs of ZIKV nucleotide including prM and E gene was produced and synthesized by *In vitro* transcription (IVT). The method validation of ZIKV RNA control and diluted ZIKV various concentrations was defined as 100% of specificity and Limit of Detection (LOD) was 0.15 PFU/ml. Furthermore, the proficiency testing was performed and showed 100% concordance. These results showed that the ZIKV real-time RT-PCR test was successful developed to detect Zika viral RNA both African and Asian lineages.

Keyword: Zika virus, *In vitro* transcription (IVT), real-time RT-PCR