

การพัฒนาวิธี REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR
สำหรับตรวจหาสปีดเดอร์อาร์เอ็นเอซบจีโนมิกของเชื้อไวรัส SARS-COV-2



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR FOR
SARS-COV-2 SUBGENOMIC RNA LEADER DETECTION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธี REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR สำหรับตรวจหาลิตเดออร์อาร์เอ็นเอซบจีโนมิกของเชื้อไวรัส SARS-COV-2
โดย	น.ส.สินินาถ เพชรราช
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุธา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์โอภาส พุทธเจริญ ดร.สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุธา)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์โอภาส พุทธเจริญ)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ)
..... กรรมการ
(อาจารย์ นายแพทย์ไทรรักษ์ พิสิษฐ์กุล)
..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร)
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

สัณนิษฐาน เพชรราช : การพัฒนาวิธี REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCRสำหรับตรวจหา
 ลิดเดอร์อาร์เอ็นเอซับจีโนมิกของเชื้อไวรัส SARS-COV-2. (DEVELOPMENT OF REAL-
 TIME QUANTITATIVE RT-PCR FOR SARS-COV-2 SUBGENOMIC RNA LEADER
 DETECTION) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. นพ.
 โอบาส พุทธเจริญ,ดร.สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ

โรคอุบัติใหม่ไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) เกิดจากการติดเชื้อ Severe Acute
 Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) โรคนี้ติดต่อกันได้ง่ายจากคนสู่คน ทำให้
 ไวรัสแพร่ระบาดอย่างต่อเนื่องไปทั่วโลก การตรวจติดตามและการประเมินไวรัสที่ปลดปล่อยเชื้อ
 (viral shedding) เป็นระยะเวลาหลายสัปดาห์ จึงมีความสำคัญต่อการป้องกันและควบคุมการ
 แพร่กระจายของเชื้อ ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการบริหารจัดการทางการแพทย์ รวมถึงมีค่าใช้จ่ายในการ
 รักษาสูง ดังนั้นการตรวจพบ SARS-CoV-2 subgenomic RNA leader (sgRNA) เป็นตัวบ่งบอก
 สถานะของไวรัสในระยะ active มีความสามารถเพิ่มจำนวนได้ ในงานวิจัยนี้ได้ตรวจติดตาม
 ระยะเวลาการปลดปล่อย SARS-CoV-2 sgRNA leader และ genomic RNA (gRNA) จาก
 ตัวอย่างระบบทางเดินหายใจ 111 ตัวอย่าง (ของผู้ป่วย COVID-19 จำนวน 10 ราย) ด้วยวิธี real-
 time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) ผลการทดลองพบว่า E-sgRNA leader สามารถตรวจ
 พบได้นานถึง 15 วัน และตรวจพบในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัส (viral load) มากกว่า 100,000
 copies/ml ($\geq 1E+05$ virus E gene copies/ml) ในขณะที่ gRNA ยังตรวจพบได้นานถึง 24 วัน
 นอกจากนี้ยังค้นพบว่าผู้ป่วย COVID-19 จำนวน 2 ใน 10 ราย ที่ E-sgRNA leader ปรากฏตัวอีก
 ครั้งหลังจากที่ตรวจไม่พบแล้วเป็นเวลา 2 วัน ถึง 8 วัน ด้วยเหตุนี้เพื่อความปลอดภัย จึงแนะนำให้
 ผู้ป่วยกักตัวหรือแยกตัวอย่างน้อย 14 วันหลังจากได้รับอนุญาตให้กลับบ้าน ดังนั้นการประเมิน E-
 sgRNA leader เป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
 ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6174080130 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: COVID-19, SARS-CoV-2 sgRNA leader, qRT-PCR

Sininat Petcharat : DEVELOPMENT OF REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR FOR SARS-COV-2 SUBGENOMIC RNA LEADER DETECTION . Advisor: Prof. THIRAVAT HEMACHUDHA, M.D. Co-advisor: Asst. Prof. OPASS PUTCHAROEN, M.D., Supaporn Wacharapluesadee, Ph.D.

Background: Duration of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) shedding is important for infection control. The presence of SARS-CoV-2 subgenomic RNA (sgRNA) leader indicates that the virus is replicative. This study examined the shedding duration of SARS-CoV-2 sgRNA leader and genomic RNA (gRNA) in diverse respiratory specimens. Methods: One hundred and eleven respiratory specimens collected sequentially from 10 COVID-19 patients with real-time RT-PCR SARS-CoV-2 orf1ab gene confirmed positive admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital were examined for SARS-CoV-2 E sgRNA leader and E gRNA by using quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR). The specimens were collected from the first day of admission until the time of orf1ab real-time RT-PCR negative of at least 2-4 consecutive days. Results: E sgRNA leader could only be detectable in specimens with $\geq 1E+05$ virus E gene copies per ml within the first 15 days after hospitalization. SARS-CoV-2 sgRNA leader was undetectable from one to 15 days earlier than that of gRNA in all patients. Reshedding of sgRNA was evident in 2 cases, both on a single occasion after being undetectable for 2-8 days. Conclusion: Assessment for the presence of sgRNA leader may be useful for therapeutic planning.

Field of Study: Medical Sciences

Academic Year: 2020

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จล่วงไปด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา หัวหน้าศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะและความช่วยเหลือในหลายสิ่งหลายอย่าง จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี ผู้ทำวิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ ที่ปรึกษาศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้ความกรุณาในการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ รวมทั้งให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคำแนะนำ จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.นพ.(พิเศษ) โอภาส พุทธเจริญ หัวหน้าศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ โรคอุบัติใหม่ด้านคลินิก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างวิเคราะห์เชื้อไวรัส COVID-19 ในการวิจัย และคำแนะนำจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ ผศ.ดร.นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ศ.ดร.นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร อ.นพ.ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล และ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณทุนการศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีการศึกษา 2561 จากสภากาชาดไทย และ หน่วยงานศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่สนับสนุนการวิจัยตลอดจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่สนับสนุนให้ใช้อุปกรณ์วิจัยภายในศูนย์ และให้กำลังใจตลอดจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

สินินาถ เพชรราช

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
คำถามของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	4
คำสำคัญ.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ไวรัสวิทยาของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019.....	6
การเพิ่มจำนวนของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019.....	12

การค้นพบไวรัสโคโรนาที่ก่อโรคในคน (Human coronavirus-HCoV).....	13
การจัดจำแนกและการกลายพันธุ์ของไวรัสโคโรนา.....	14
การระบาดของไวรัสโรโคนาสายพันธุ์ใหม่ 2019	15
วิวัฒนาการของไวรัสโรโคนาสายพันธุ์ใหม่ 2019.....	16
การตรวจวินิจฉัยไวรัสโรโคนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 ทางห้องปฏิบัติการ	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	26
ประชากรตัวอย่าง.....	26
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	26
วิธีดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	45
บรรณานุกรม.....	48
ภาคผนวก.....	51
ภาคผนวก ก	52
ภาคผนวก ข	54
ภาคผนวก ค	55
ประวัติผู้เขียน.....	75

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 โพรตีนที่ได้จากการแปลรหัสสารพันธุกรรม และหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ	7
ตาราง 2 รายละเอียดของ primers และ probe ที่จำเพาะต่อยีน E ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2....	28
ตาราง 3 ส่วนผสมสำหรับการตรวจ genomic RNA real-time qRT-PCR.....	31
ตาราง 4 ส่วนผสมสำหรับการตรวจ subgenomic RNA leader real-time qRT-PCR.....	31
ตาราง 5 รายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม Real-time qRT-PCR.....	32
ตาราง 6 ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) genomic RNA real time qRT-PCR.....	35
ตาราง 7 ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) subgenomic RNA leader real time qRT-PCR.	37
ตาราง 8 ผลการทดลองการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19	40

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ไดอะแกรมแสดง whole genome ของไวรัส SARS-CoV-2.....	6
ภาพประกอบ 2 ไดอะแกรมแสดงกลไก Discontinuous RNA dependent RNA synthesis.....	13
ภาพประกอบ 3 ไดอะแกรมแสดงระยะเวลาการค้นพบไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ก่อโรคในคน. 14	
ภาพประกอบ 4 ไดอะแกรมแสดงการจัดจำแนกและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโคโรนา.....	15
ภาพประกอบ 5 การจัดกลุ่มเชื้อไวรัสโควิด-19 และตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม	18
ภาพประกอบ 6 กราฟแสดงการเพิ่มสัญญาณแสงของ reporter ที่เพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบการทำ PCR เป็นแบบทวีคูณ (exponential) มีลักษณะเป็น S-shape	20
ภาพประกอบ 7 การทำงานของ Hydrolysis probe	21
ภาพประกอบ 8 ขั้นตอน Real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR).....	22
ภาพประกอบ 9 เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ในระยะต่าง ๆ	25
ภาพประกอบ 10 ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของ leader primer และ E gene primer.....	29
ภาพประกอบ 11 โปรแกรมที่ใช้สำหรับการคำนวณค่า copy number calculator for genomic RNA real time PCR [แหล่งที่มา: scienceprimer.com].....	29
ภาพประกอบ 12 โปรแกรมที่ใช้สำหรับการคำนวณค่า copy number calculator for subgenomic RNA leader real time PCR [แหล่งที่มา: scienceprimer.com].....	30
ภาพประกอบ 13 subgenomic RNA leader sequence.....	34
ภาพประกอบ 14 การวิเคราะห์ subgenomic RNA leader sequence ด้วยโปรแกรม BLAST....	35
ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงผลการทดสอบความไว (Sensitivity) genomic RNA	36
ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงค่า standard curve ระหว่างค่า Ct และ concentration genomic RNA	36
ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงผลการทดสอบความไว (Sensitivity) subgenomic RNA leader....	37

ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงค่า standard curve ระหว่างค่า Ct และ concentration subgenomic RNA leader 38

ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณไวรัส (RNA viral load) ระหว่างกลุ่มที่ตรวจพบ subgenomic RNA leader (Detected) กับกลุ่มที่ตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader (Not detected)..... 44

ภาพประกอบ 20 การรันเจล PCR product ที่ได้จากการตรวจหา subgenomic RNA leader ด้วยวิธี real time RT-PCR..... 54

ภาพประกอบ 21 การวิเคราะห์ subgenomic RNA leader และ genomic RNA sequence ด้วยการทำให้ alignment 54



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 หรือ Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) เป็นโรคอุบัติใหม่ ที่ทำให้เกิดความตื่นตระหนกและส่งผลกระทบต่อทางด้านสาธารณสุขของประชากรในหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งแผนการรักษาและระยะเวลาในการกักตัวเพื่อการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส โดยยึดการตรวจไม่พบเชื้อเป็นหลัก ในปัจจุบันการตรวจทางห้องปฏิบัติการของโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 จะใช้วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจซึ่งทางองค์การอนามัยโลกแนะนำให้เก็บตัวอย่างส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract) เช่น nasopharyngeal swab, oral pharyngeal swab และ/หรือ ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (lower respiratory tract) เช่น sputum, bronchoalveolar lavage นอกจากนี้เลือดและอุจจาระอาจเป็นสิ่งส่งตรวจได้เช่นกัน [1] รวมถึงการตรวจติดตามการปลดปล่อยเชื้อไวรัส (viral shedding) จากงานวิจัยของ Ania Wajnberg และคณะได้ทำการตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 จากตัวอย่าง nasopharyngeal swab ด้วยวิธี rRT-PCR ซึ่งมีการตรวจแบบ follow up เพื่อการรักษา พบว่าประมาณ 19% ผลการตรวจยืนยัน ด้วยวิธี rRT-PCR พบสารพันธุกรรมของเชื้อได้นานสุด 42 วันหลังเริ่มมีอาการ (เฉลี่ย 20 วัน) และนานสุด 28 วันหลังการรักษามีอาการดีขึ้นแล้ว (เฉลี่ย 12 วัน) แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าผู้ป่วยยังมีการติดเชื้ออยู่หรือไม่ หรืออาจเป็นเพียงการตรวจพบบางส่วนของสารพันธุกรรมไวรัสที่ค้างอยู่ในร่างกาย [2] และงานวิจัยของ Yongjian Wu และคณะ ตรวจยืนยันไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี rRT-PCR ในตัวอย่างระบบทางเดินหายใจ และตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1-2 วัน ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการปลดปล่อยไวรัส (virus shedding) ทางอุจจาระเป็นเวลานานที่สุดเกือบ 5 สัปดาห์ (เฉลี่ย 11.2 วัน) หลังจากที่ตัวอย่างระบบทางเดินหายใจตรวจยืนยันด้วยวิธี rRT-PCR ไม่พบเชื้อแล้ว อาจจะนำไปสู่การติดต่อผ่านทาง fecal-oral transmission ได้ แต่ยังคงขาดการศึกษาเกี่ยวกับความมีชีวิตของเชื้อไวรัส (viral viability) ในตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธีทาง molecular [3] อย่างไรก็ตามการศึกษาระยะเวลาที่ผู้ติดเชื้อปล่อยเชื้อออกมาและแพร่เชื้อได้ยังไม่ชัดเจน โดยแพร่เชื้อได้ในช่วงที่ผู้ป่วยมีอาการ หรือแพร่เชื้อได้ในผู้ป่วยที่อาการหนักมากกว่าผู้ป่วยที่มีอาการน้อย หรือแพร่เชื้อได้ในช่วงแรกมากกว่าช่วงท้ายของการติดเชื้อ หรือผู้ติดเชื้อที่มีอาการไม่รุนแรงหรือไม่มีอาการ ซึ่งอาจจะมากถึงร้อยละ 25-50 ของผู้ที่ติดเชื้อทั้งหมด อาจจะแพร่เชื้อได้ เพราะมีการตรวจพบปริมาณไวรัส เท่า ๆ กับผู้ติดเชื้อที่มีอาการ [4]

ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรม RNA ของไวรัสได้ถึง 10 วันหลังเริ่มมีอาการ แต่อาจตรวจพบได้นานถึง 37 วัน [5-8] อย่างไรก็ตามการตรวจพบสารพันธุกรรม RNA ของไวรัสจากสารคัดหลั่งระบบทางเดินหายใจไม่ได้บ่งชี้ว่ามีไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อได้ มีการศึกษาพบว่าแม้จะตรวจพบปริมาณไวรัส (viral RNA) ได้มากกว่า 3 สัปดาห์ แต่สามารถเพาะเชื้อไวรัสขึ้นได้เพียง 8 วันแรกหลังการติดเชื้อ [9, 10] ต่อมาทีมงานวิจัยเผยแพร่ออกมาที่พยายามจะหาตัวกำหนดว่าไวรัสที่ยังปล่อยออกมานั้นสามารถติดต่อแพร่เชื้อได้หรือไม่ จากงานวิจัยของ Wolfel และคณะใช้วิธี RT-PCR ตรวจติดตาม subgenomic mRNA ซึ่งบ่งบอกว่าไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยตรวจยืนยันจากตัวอย่าง Throat swab ผลการศึกษาตรวจพบ subgenomic mRNA ในตัวอย่าง Throat swab ในช่วง 5 วันแรกหลังเริ่มมีอาการ แสดงให้เห็นว่าบริเวณทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract) เป็นที่อยู่อาศัยและเพิ่มจำนวนไวรัส COVID-19 [10] และงานวิจัยของ Aleksandra และคณะใช้วิธี RT-PCR ตรวจติดตาม subgenomic mRNA โดยตรวจสอบความสามารถของการเพิ่มจำนวนไวรัส COVID-19 ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human respiratory epithelium (HAE) ผลการศึกษาตรวจพบ subgenomic mRNA จำนวนมากในเซลล์ HAE ที่ติดเชื้อ ซึ่งทำให้นักวิจัยเชื่อว่าการตรวจพบ subgenomic mRNA เป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ติดเชื้ออย่างแท้จริง [11]

ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาเพื่อจำแนกสถานะของเชื้อไวรัสระหว่าง active viral replication (subgenomic RNA leader) กับ inactive viral replication (genomic RNA) ด้วยวิธี quantitative real-time Reverse Transcription PCR (real-time qRT-PCR) แบบ monoplex ประกอบด้วยการตรวจหา genomic RNA ที่ตำแหน่งยีน Envelope (E) และการตรวจหา subgenomic RNA leader ที่ตำแหน่งยีน 5' UTR leader ต่อกับยีน Envelope (E) ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้สภาวะอุณหภูมิเดียวกัน และตรวจวัดปริมาณไวรัส (viral load) ได้พร้อมกัน ซึ่งการตรวจสอบไวรัสเชิงปริมาณ สามารถใช้อ้างอิงการวิเคราะห์เปรียบเทียบเชิงปริมาณระหว่าง genomic RNA กับ subgenomic RNA leader เพื่อนำไปใช้วางแผนการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำถามของการวิจัย

1. subgenomic RNA leader สามารถวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนไวรัสในตัวอย่างผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ได้หรือไม่
2. สามารถตรวจหา subgenomic RNA leader เชิงปริมาณในตัวอย่างผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 โดยใช้วิธี real-time qRT-PCR ได้หรือไม่

สมมติฐานของการวิจัย

1. subgenomic RNA leader สามารถวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนไวรัสในตัวอย่างผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19
2. วิธี real-time qRT-PCR สามารถตรวจหา subgenomic RNA leader เชิงปริมาณในตัวอย่างผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกสถานะของไวรัสระหว่าง active viral replication (subgenomic RNA leader) กับ inactive viral replication (genomic RNA) ในตัวอย่างผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19
2. เพื่อพัฒนาวิธี real-time qRT-PCR สำหรับตรวจหา subgenomic RNA leader เชิงปริมาณในตัวอย่างผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากปริมาณของสารพันธุกรรมมีจำนวนจำกัดจึงไม่สามารถทำการทดลองซ้ำหรือทำการทดลองเพิ่มเติมในบางส่วนที่ต้องการศึกษา และตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจะต้องเก็บแบบ Follow up

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ชุดตรวจวิเคราะห์ real-time qRT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถนำไปใช้จำแนกสถานะไวรัสระหว่าง active viral replication (subgenomic RNA leader) กับ inactive viral replication (genomic RNA) เพื่อใช้ตรวจติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19
2. พัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อสนับสนุนวิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อไวรัส (viral culture) ที่ใช้ในการตรวจหาไวรัสในระยะติดเชื้อ (infective virus) สามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้เร็วกว่า
3. ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 1 ฉบับ โดยตีพิมพ์ในวารสารที่เกี่ยวข้องกับด้านไวรัสวิทยา หรือการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ เป็นต้น

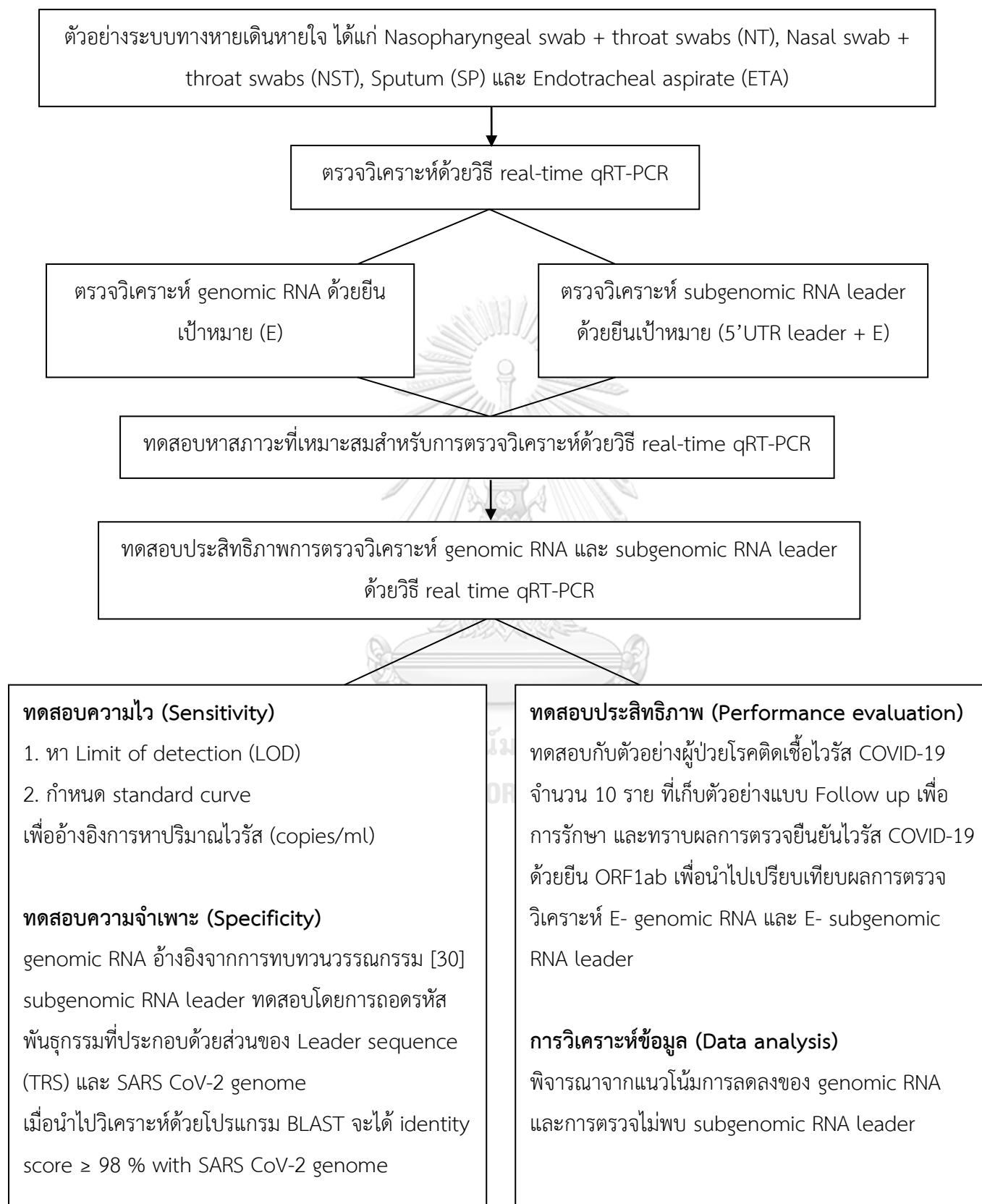
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

COVID-19	=	Coronavirus Disease 2019
SARS-CoV-2	=	Severe Respiratory Syndrome Coronavirus-2
RNA	=	Ribonucleic acid
ORF	=	Open Reading Frame
NPS	=	Nasopharyngeal swab
TS	=	Throat swab
NT	=	Nasopharyngeal swab + Throat swab
SP	=	Sputum
NS	=	Nasal swab
NST	=	Nasal swab + Throat swab
ETA	=	Endotracheal Aspirate
Ct	=	Cycle threshold
μL	=	Microliter
ml	=	Milliliter
BSL3	=	Biosafety Level 3
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
Real time qRT-PCR	=	Real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
rRT-PCR	=	Real time reverse transcription polymerase chain reaction
ICTV	=	International Committee on Taxonomy of Viruses

คำสำคัญ

SARS-CoV-2, COVID-19, Real time qRT-PCR, Discontinuous RNA dependent RNA synthesis, subgenomic RNA leader

ขอบเขตของการวิจัย



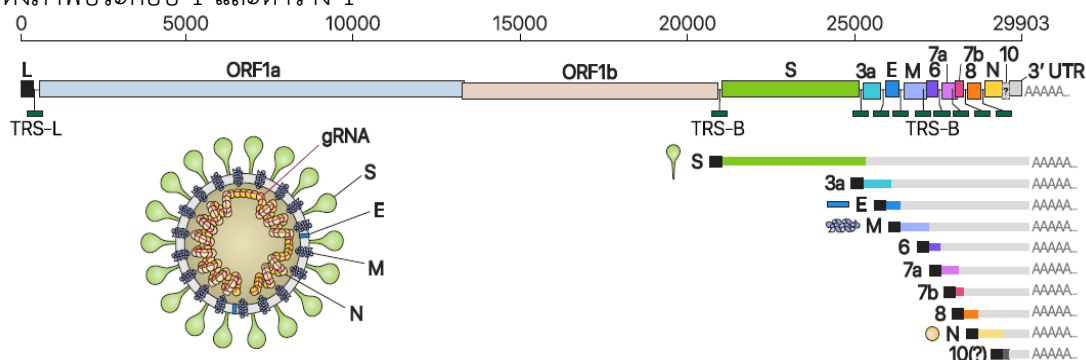
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสวิทยาของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 หรือ Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) เกิดจากการติดเชื้อไวรัส severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) นับเป็นไวรัสโคโรนาชนิดที่ 7 ที่ก่อโรคในคน ซึ่งกำลังแพร่ระบาดไปทั่วโลก ณ ขณะนี้ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายจีโนมที่แยกได้จากน้ำล้างปอดของผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 ด้วยวิธี Next generation metagenomic RNA sequencing พบว่ามีขนาดจีโนมประมาณ 29,903 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อในกลุ่มไวรัสซาร์สในค้างคาว (Bat SARS-like coronavirus) ประมาณร้อยละ 88, ไวรัสซาร์สในคน (SARS-CoV) ประมาณร้อยละ 79 และไวรัส MERS-CoV ประมาณร้อยละ 50 ดังนั้นไวรัสชนิดนี้จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Betacoronavirus (lineage B) เช่นเดียวกับเชื้อไวรัสซาร์สในคน [12, 13] ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 ถูกจัดอยู่ใน Coronaviridae Family มีสายจีโนมเป็น (+) ssRNA ประกอบด้วย 5'-cap และ 3'-poly-A-tail ทำให้สามารถเกิดการ transcription ภายใน host ได้ และมีโครงสร้างจีโนมซึ่งแบ่งเป็น 2 ใน 3 ส่วนเริ่มจากด้านปลาย 5' ของโครงสร้างประกอบด้วย 2 open reading frame (ORF) ขนาดใหญ่ (ORF1a และ ORF1b) ทำหน้าที่ในการสร้าง non-structural protein (nsp) 16 ชนิด (nsp1-16) มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ replication ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้าง RNA สายใหม่ และการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งบริเวณนี้มีข้อมูลนิวคลีโอไทด์ไม่แตกต่างกันมากนัก (conserved region) สามารถนำไปใช้ในการจัดกลุ่มไวรัสได้ และอีก 1 ใน 3 ส่วนที่อยู่ทางด้านปลาย 3' ทำหน้าที่สร้างโปรตีนโครงสร้างหลัก (structural protein) มีอยู่ 4 ชนิดได้แก่ โปรตีน spike (S), membrane (M), envelope (E) และ nucleocapsid (N) พบได้ในไวรัสโคโรนาทุกสายพันธุ์ [14, 15]

ดั่งภาพประกอบ 1 และตาราง 1



ภาพประกอบ 1 ไดอะแกรมแสดง whole genome ของไวรัส SARS-CoV-2

และโครงสร้างอนุภาคไวรัส

ตาราง 1 โปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสสารพันธุกรรม และหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ
ของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019

RNA Segment	โปรตีน	หน้าที่	ขนาดโปรตีน
1	Spike (S) (ORF2)	S1 binds to the host's receptor hACE2, S2 mediates viral and host membrane fusion.	~1273 a.a.
2	Nucleocapsid (N) (ORF9a)	Nucleocapsid binds viral genomic RNA. Involved in genome protection, viral RNA replication, and virion assembly.	~419 a.a.
3	Membrane (M) (ORF5)	Membrane/matrix protein is the most abundant structural component of the virion, and very conserved.	~222 a.a.
4	Envelope (E) (ORF4)	Envelope is a single-pass type III membrane protein involved in viral assembly, budding, and pathogenesis.	~75 a.a.
5	Nonstructural protein 1	Inhibits host translation leading to host mRNA degradation through cleavage near their 5'UTRs. Promotes viral gene expression and immunoevasion in part by interfering with interferon-mediated signaling.	~180 a.a.
6	Nonstructural protein 2	Interacts with host factors prohibitin 1-2 which are involved in many cellular processes including mitochondrial biogenesis.	~638 a.a.
7	Nonstructural protein 3	processes the viral polyprotein to release nsp1, nsp2, and nsp3	~1945 a.a.
8	Nonstructural protein 4	Required for viral replication by inducing (with nsp3) assembly and double-membrane cytoplasmic vesicles.	~500 a.a.
9	Nonstructural protein 5	Cleaves at 11 sites in the polyprotein to release nsp4-nsp16. It is also responsible for nsp maturation.	~306 a.a.

RNA Segment	โปรตีน	หน้าที่	ขนาดโปรตีน
10	Nonstructural protein 6	Double-membrane vesicles in infected cells. It also limits autophagosome expansion and interferes with autophagosome delivery of viral factors to lysosomes for destruction.	~290 a.a.
11	Nonstructural protein 7	As a cofactor for the RNA-dependent RNA polymerase nsp12 May have processivity or RNA primase function.	~83 a.a.
12	Nonstructural protein 8	As a cofactor for the RNA-dependent RNA polymerase nsp12 Mutation of nsp8 is impacted RNA synthesis.	~198 a.a.
13	Nonstructural protein 9	Functions in viral replication as a dimeric ssRNA-binding protein.	~113 a.a.
14	Nonstructural protein 10	To stimulate activities in the formation of the viral mRNA capping machinery.	~139 a.a.
15	Nonstructural protein 11	nsp 11 is a pp1a cleavage product at the nsp10/11 boundary. For pp1ab, it is a frameshift product that becomes the N-terminal of nsp12.	~13-23 a.a.
16	Nonstructural protein 12	nsp12 is the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) performing both replication and transcription of the viral genome.	~932 a.a.
17	Nonstructural protein 13	Working with nsp12 in viral genome replication, Involved in viral mRNA capping, and associates with nucleoprotein in membranous complexes.	~601 a.a.
18	Nonstructural protein 14	Proofreading during RNA replication and Viral mRNA capping	~527 a.a.
19	Nonstructural protein 15	Endoribonuclease that favors cleavage of RNA at the 3'-ends	~346 a.a.

RNA Segment	โปรตีน	หน้าที่	ขนาดโปรตีน
20	Nonstructural protein 16	Viral mRNA capping. It may also work against host cell antiviral sensors.	~298 a.a.
21	ORF3a	May be involved in viral release. Importantly, it also activates both NF- κ B and NLRP3 inflammasome and contributes to the generation of cytokine storm.	~275 a.a.
22	ORF3b	ORF3b suppresses IFN induction	~22 a.a.
23	ORF6	ORF6 is considered to be one of the important virulent factors for SARS-CoV.	~61 a.a.
24	ORF7a	ORF7a interacts with S, M, E, and ORF3a in SARS-CoV-2	~121 a.a.
25	ORF7b	Involved in human infectivity of SARS-CoV-2	~43 a.a.
26	ORF8	Might be a luminal ER membrane-associated protein. It may trigger ATF6 activation and affect the unfolded protein response (UPR).	~121 a.a.
27	ORF9b	ORF9b is coded for in an alternative ORF within the N gene	~97 a.a.
28	ORF9c	Involvement in lipid remodeling and the ER stress response.	~70 a.a.
29	ORF10	Interacts with factors in the CUL2 RING E3 ligase complex and thus may modulate ubiquitination.	~38 a.a.

[แหล่งที่มา: A review of the SARS-CoV-2 (COVID-19) genome and proteome.]

โปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (nsp) 16 ชนิด ได้แก่

Non-structural protein 1 (nsp1): โปรตีนตัวแรกทำหน้าที่ยับยั้งเซลล์ที่ติดเชื้อไม่ให้ผลิตโปรตีนของโฮสต์ แต่ผลิตโปรตีนของไวรัสแทน ทำให้เซลล์โฮสต์ไม่สามารถรวบรวมโปรตีนที่จะมาต่อต้านไวรัสได้ และทำลายระบบภูมิคุ้มกันบางส่วนไป

Non-structural protein 2 (nsp2): ทำหน้าที่ปฏิสัมพันธ์กับเซลล์โฮสต์ และเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารชีวภาพของ mitochondrial

Non-structural protein 3 (nsp3): เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ทำหน้าที่ในการตัดโปรตีนก่อน nsp1, nsp2 และ nsp3 ให้หลุดออกจากกัน เพื่อให้ออกปฏิบัติการตามหน้าที่เฉพาะของแต่ละก่อนโปรตีน และยังทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงโปรตีนอื่นๆ ของเซลล์ที่ติดเชื้อไม่ให้ทำงานเป็นปกติ ตัวอย่างเช่น ในเซลล์ที่ปกติจะมีการติดเครื่องหมาย (tag) บนโปรตีนของเซลล์ที่หมดอายุเพื่อทำลายทิ้ง แต่ nsp3 จะทำหน้าที่ลบเครื่องหมายเหล่านั้นออกไป ทำให้โปรตีนของเซลล์เสื่อมสมรรถนะในการต่อสู้กับไวรัสลดลง

Non-structural protein 4 (nsp4): ทำงานร่วมกับโปรตีนอื่น ๆ ในการสร้างฟองที่มีของเหลว (vesicles) อยู่ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งจะใช้เป็นที่ย้ายพันธุ์ (viral replication) ไวรัสตัวใหม่ขึ้นมา

Non-structural protein 5 (nsp5): โปรตีนท่อนี้ทำหน้าที่ในการตัดโปรตีนก่อน nsp4 - nsp16 ให้หลุดออกจากกัน

Non-structural protein 6 (nsp6): ทำหน้าที่ในการผลิตฟอง (vesicles) เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์

Non-structural protein 7 (nsp7) และ non-structural protein 8 (nsp8): โปรตีนสองท่อนี้ช่วย nsp12 ในการสังเคราะห์ RNA

Non-structural protein 9 (nsp9): ทำหน้าที่ในการคัดลอกขยายพันธุ์ (viral replication) ไวรัสตัวใหม่ขึ้นมา และทำหน้าที่เจาะช่องเล็ก ๆ เข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ

Non-structural protein 10 (nsp10): โดยปกติเซลล์โฮสต์จะมีโปรตีนที่ตรวจจับ RNA ของไวรัสและมีการส่งสัญญาณเมื่อตรวจพบ แต่ nsp10 จะทำงานร่วมกับ nsp16 ในการพรองตัว ทำให้ไวรัสไม่ถูกตรวจจับและไม่ถูกทำลายได้ และทำหน้าที่ในการกระตุ้นสร้าง mRNA ของไวรัส

Non-structural protein 11 (nsp11): โปรตีนท่อนี้ทำงานร่วมกับ nsp12 ในการสร้าง frameshift ในกระบวนการ viral replication

Non-structural protein 12 (nsp12): โปรตีนท่อนี้ทำหน้าที่ในการคัดลอกรหัสพันธุกรรมมาต่อกันทำให้ได้ไวรัสตัวใหม่ทั้งจีโนม

Non-structural protein 13 (nsp13): โดยปกติ RNA จะอยู่ในสภาพขดบิดเป็นเกลียว nsp13 ทำหน้าที่เป็นตัวคลายเกลียว RNA ให้ออก เพื่อให้อ่านและคัดลอกรหัสพันธุกรรม

Non-structural protein 14 (nsp14): ขณะที่ nsp12 กำลังทำการคัดลอกรหัสพันธุกรรมเพื่อสร้าง RNA ชุดใหม่ อาจเกิดความผิดพลาดในการคัดลอกได้ nsp14 จะทำหน้าที่เป็นหน่วยพิสูจน์ข้อมูล ซึ่งคอยตรวจจับว่าการคัดลอกถูกต้องหรือไม่ หากตรวจพบจุดผิดพลาด (ข้อมูลไม่ตรงกับต้นฉบับ) nsp14 จะตรงเข้าไปตัดส่วนที่ผิดพลาดออก เพื่อให้สามารถนำเอาข้อมูลที่ถูกต้องมาต่อแทน

Non-structural protein 15 (nsp15): ทำหน้าที่ในการทำลายซาก RNA ของไวรัสที่หลงเหลือ เพื่อไม่ให้กลไกการป้องกันไวรัสของเซลล์ที่ติดเชื้อจดจำและเข้ามาทำลายได้

Non-structural protein 16 (nsp16): ทำงานร่วมกับ nsp10 ในการพรางตัวไม่ให้โปรตีนของเซลล์ เจอกับ RNA ของไวรัสแล้วเข้ามาทำลายได้

นอกจากโปรตีน ORF ซึ่งไม่ใช่โปรตีนส่วนโครงสร้างของไวรัสแล้ว ยังมีโปรตีนที่เรียกว่า Accessory Protein ต่าง ๆ ซึ่งเป็นหน่วยเสริมการทำงานที่ถูกสร้างขึ้นมาเพิ่มเติมในไวรัส SARS-CoV-2 เพื่อช่วยให้การทำงานได้สมบูรณ์ขึ้น Accessory Protein เหล่านี้ ได้แก่

ORF3a: ทำหน้าที่เจาะรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้ไวรัสหลบหนีออกมา ทำให้ไวรัสแพร่พันธุ์ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์เกิดการอักเสบ ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ที่ติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2

ORF3b: ทำหน้าที่ยับยั้งการเหนี่ยวนำของระบบ IFN

ORF6: ทำหน้าที่ดักจับสัญญาณที่ส่งจากเซลล์ที่ติดเชื้อไปยังระบบภูมิคุ้มกันไม่ให้รับรู้ และยังจัดการกับระบบป้องกันภายในเซลล์ได้อีกด้วย

ORF7a: ทำหน้าที่ปฏิสัมพันธ์กับ ORF3a และโปรตีนโครงสร้าง S, M และ E

ORF7b: ขณะที่ไวรัสพยายามหลบหนีออกนอกเซลล์ เซลล์จะดักจับไวรัสด้วยโปรตีนที่เรียกว่า tetherin ORF7b ทำหน้าที่ตัดการส่งลำเลียง tetherin ทำให้ไวรัสมีโอกาสในการหลบหนีออกนอกเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้ ORF7b ทำให้เกิดการทำลายตัวเองของเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ปอดของผู้ติดเชื้อเสียหายอย่างรุนแรง

ORF8: ทำหน้าที่รบกวนกระบวนการสร้างโปรตีนของ ER ทำให้เกิด ATF6 activation และ unfolded protein response

ORF9b: ทำหน้าที่ปฏิสัมพันธ์โปรตีนโครงสร้าง N

ORF9c: ทำให้เกิด ER stress

ORF10: ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน

นอกจากนี้ SARS-CoV-2 ยังมีโปรตีนที่เป็นส่วนโครงสร้างของไวรัส (structural protein) ได้แก่

Spike protein (S): ทำหน้าที่เป็นหนามบนผิวของไวรัส มีรูปร่างที่สามารถเสียบเข้ากับโปรตีนที่เรียกว่า ACE2 ทำให้ไวรัสสามารถยึดเกาะกับเซลล์และเจาะเข้าไปในเซลล์โฮสต์ได้

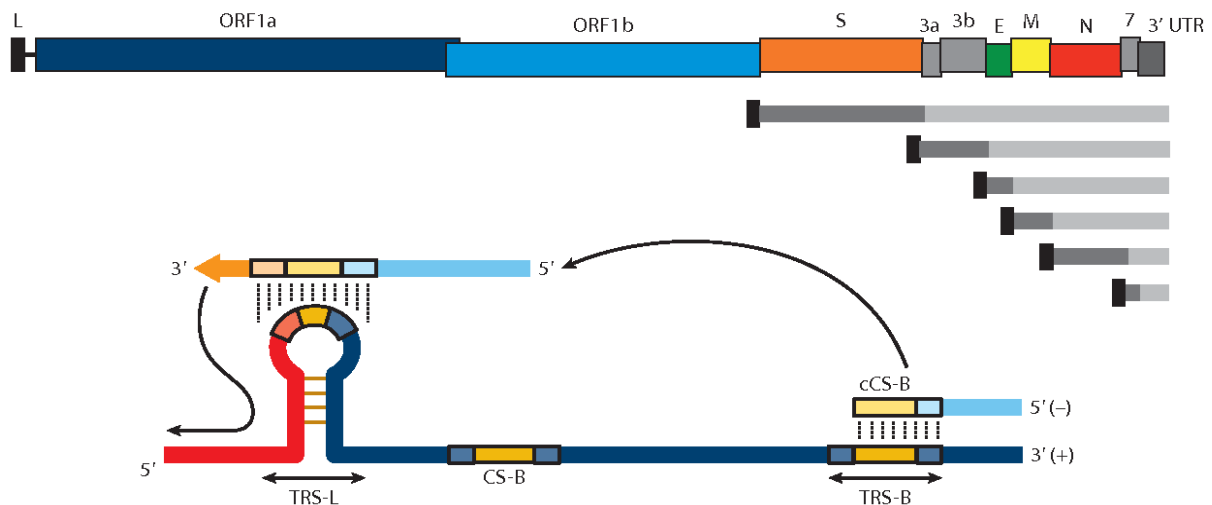
Envelope protein (E): โปรตีนส่วนนี้เข้าไปยึดติดกับโปรตีนในเซลล์ทำหน้าที่ควบคุมการเปิด/ปิดการทำงานของยีนมนุษย์ ซึ่งอาจทำให้ยีนมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานไป เกิดโรคในที่สุด

Membrane protein (M): เป็นส่วนประกอบทำหน้าที่เป็นเยื่อหุ้มภายนอกของไวรัส SARS-CoV-2

Nucleocapsid protein (N): ทำหน้าที่ปกป้อง RNA และช่วยเสริมความแข็งแรงให้แก่ RNA โดยโปรตีน N จะเชื่อมต่อกันพันรอบ ๆ RNA เอาไว้

การเพิ่มจำนวนของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019

กลไกการติดเชื้อและการเพิ่มจำนวนของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 เกิดจากไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย โดย spike protein จับกับ human angiotensin converting enzyme 2 (hACE-2) receptor ที่พบมากในเซลล์เยื่อหุ้มปอด เมื่อไวรัสเข้ามาสู่ภายในเซลล์แล้วจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ protease ทำให้เปลือกหุ้มไวรัสและเยื่อหุ้มเซลล์ของคนผสมกัน (fusion) นำไปสู่การปลดปล่อยสารพันธุกรรม (+) ssRNA แล้วเกิดกระบวนการแปลรหัส (translation) โปรตีนชนิด non-structural protein (ORF1a และ ORF1b) และเกิดกระบวนการ replication จากการทำงานของ RNA dependent RNA polymerase (RdRp) : nsp12 ทำให้มีการสร้าง minus-strand genomic RNA เป็นแม่แบบของการสร้าง plus-strand genomic RNA ของไวรัสตัวใหม่ ส่วนการสร้างโปรตีนชนิด structural protein เป็นโปรตีนที่ไวรัสใช้ประกอบเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์นั้นถูกสร้างมาจาก subgenomic mRNAs ซึ่งไวรัสในกลุ่มโคโรนาจะมีคุณสมบัติประจำตัว คือ ไวรัสมีการถอดรหัสพันธุกรรมที่ซับซ้อน (nested transcription) เริ่มต้นจากการใช้ส่วนของ genomic RNA เป็นแม่แบบของการสร้าง minus-strand subgenomic mRNAs ขึ้นมาก่อน จากนั้นใช้เป็นแม่แบบของการสร้าง plus-strand subgenomic mRNAs ทำให้เกิดการถอดรหัสจาก 3'-terminal พอดีมาเจอกับ TRS-B sequence ทำให้การถอดรหัสพันธุกรรมดำเนินไปต่อไม่ได้ จึงอาศัยกลไก Discontinuous RNA dependent RNA synthesis [ดังภาพประกอบ 2] ควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรมให้ดำเนินไปต่อได้ โดยการกระโดดข้าม (switching) ไปยังด้านหน้า 5' leader sequence ของส่วน ORF ทำให้ได้ส่วน TRS-L 5' leader sequence ต่อกับส่วน TRS-B sequence ที่อยู่ด้านหน้าแต่ละโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ทำให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรม RNA สายสั้นๆ ที่เรียกว่า subgenomic mRNAs จากนั้นแต่ละสายของ subgenomic mRNAs ทำหน้าที่แปลรหัสพันธุกรรม (translation) เป็นโปรตีนโครงสร้าง (S, E, M, N) และโปรตีนเสริม (orf3a, orf3b, orf6, orf7a, orf7b, orf8, orf9b, orf9c, orf10) เพื่อประกอบร่างกันให้เป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ โดยอาศัยการทำงานของ rough endoplasmic reticulum และ/หรือ Golgi complex membrane สุดท้ายไวรัสจะอาศัยการ budding ออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อไปติดเชื้อในเซลล์อื่นต่อไป [16]



ภาพประกอบ 2 ไดอะแกรมแสดงกลไก Discontinuous RNA dependent RNA synthesis

การค้นพบไวรัสโคโรนาที่ก่อโรคในคน (Human coronavirus-HCoV)

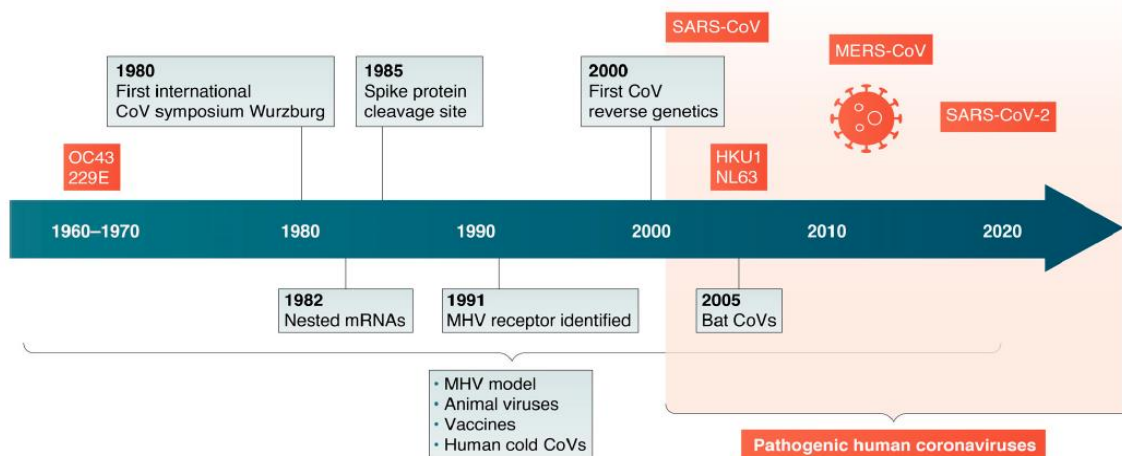
นับตั้งแต่มีรายงานการค้นพบไวรัสโคโรนาที่ก่อโรคในคน (Human coronavirus-HCoV) ครั้งแรกใน ค.ศ. 1960 จนกระทั่งถึงปัจจุบัน (ปี ค.ศ. 2019) มีการค้นพบไวรัสโคโรนารวมทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ประกอบด้วย 4 สายพันธุ์ ที่ก่อโรคไม่รุนแรง ได้แก่ HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 และ HCoV-HKU1 และอีก 2 สายพันธุ์ ที่ก่อโรครุนแรง ได้แก่ ไวรัสซาร์ส (Severe acute respiratory syndrome coronavirus: SARS-CoV) และ ไวรัสเมอร์ส (Middle East respiratory syndrome coronavirus: MERS-CoV) ซึ่งมีรายงานในการค้นพบไวรัสโคโรนาที่ก่อโรคในคน ดังนี้ ใน ค.ศ. 1960-1970 มีรายงานการค้นพบไวรัสโคโรนาที่ก่อโรคในคน ได้แก่ HCoV-229E และ HCoV-OC43 เป็น 2 สายพันธุ์แรก มักก่อโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนบนที่ไม่รุนแรง เช่น ไข้หวัดธรรมดา

ใน ค.ศ. 2000 มีการระบาดของไวรัสซาร์ส (SARS-CoV) ทางตอนล่างของจีน โดยไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดโรคปอดบวมรุนแรงที่มีภาวะหายใจลำบากร่วมด้วย ไวรัสซาร์สได้แพร่ระบาดไปทั่วโลกอย่างรวดเร็วเป็น pandemic โดยมีผู้ติดเชื้อสูงถึง 8,000 ราย และมีอัตราการตายถึงร้อยละ 10

ใน ค.ศ. 2004-2005 มีรายงานการค้นพบไวรัสโคโรนาอุบัติใหม่ 2 สายพันธุ์ คือ HCoV-NL63 และ HCoV-HKU1 ตามลำดับ ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง เช่น หลอดลมอักเสบ และปอดอักเสบ เป็นต้น

ใน ค.ศ. 2012 มีการระบาดของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2012 (MERS-CoV) ในประเทศแถบตะวันออกกลาง ซึ่งก่อให้เกิดโรคปอดบวมรุนแรงนำไปสู่ภาวะหายใจลำบากเฉียบพลัน โรคนี้มีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 30

ใน ค.ศ. 2019 มีการระบาดของไวรัสโรคนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (SARS-CoV-2) ในเมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ สาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งก่อโรคปอดบวมสามารถทำให้เกิดระบบหายใจล้มเหลวได้ เมื่อวันที่ 11 มีนาคม ในปีเดียวกัน ทางองค์การอนามัยโลก ได้ประกาศโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ที่ระบาดใหญ่เป็น pandemic มีจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว มีอัตราการเสียชีวิตจากโรคประมาณร้อยละ 4.6 [17] [ดั่งภาพประกอบ 3]



ภาพประกอบ 3 ไดอะแกรมแสดงระยะเวลาการค้นพบไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ก่อโรคในคน

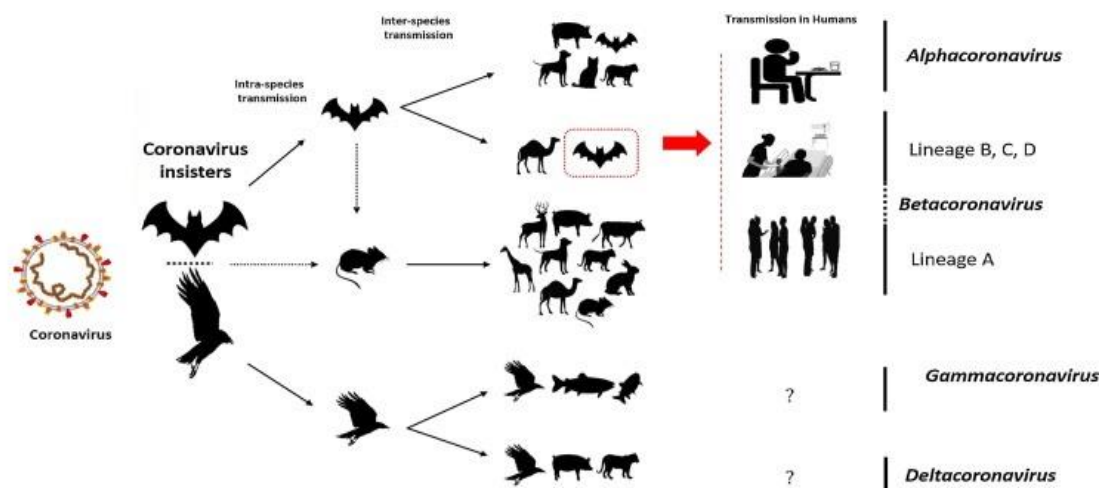
การจัดจำแนกและการกลายพันธุ์ของไวรัสโคโรนา

ไวรัสโคโรนามีหลายกลุ่มที่สามารถติดเชื้อได้ทั้งในสัตว์และคน ซึ่งสามารถแบ่งไวรัสโคโรนาออก เป็น 4 จีนัส ตาม ICTV ดังนี้

- 1) Genus Alphacoronavirus ทำให้ติดเชื้อได้ในสัตว์และคน ได้แก่ HCoV-NL63 และ HCoV-229E
- 2) Genus Betacoronavirus ทำให้ติดเชื้อได้ในสัตว์และคน ได้แก่ HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV และ SARS-CoV-2 (human coronavirus) ที่ก่อให้เกิดโรค COVID-19
- 3) Genus Gammacoronavirus ทำให้ติดเชื้อได้ในสัตว์ ได้แก่ avian coronaviruses
- 4) Genus Deltacoronavirus ทำให้ติดเชื้อได้ในสัตว์ซึ่งยังไม่มีรายงานการติดเชื้อในคน

โดยไวรัสสายพันธุ์ HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 เป็นไวรัสโคโรนาในกลุ่มที่ก่อโรคในคน ทำให้มีอาการของระบบทางเดินหายใจที่ไม่รุนแรง และมักมีการติดเชื้อแบบไม่มีอาการ ส่วนไวรัสโคโรนาที่ก่อโรครุนแรงในคนที่ข้ามสปีชีส์มาจากสัตว์ เช่น SARS-CoV, MERS-CoV และ SARS-CoV-2 เป็นไวรัสโคโรนามีสารพันธุกรรมเป็น RNA จึงมีโอกาสกลายพันธุ์สูง และสามารถเกิดการติดเชื้อข้ามสปีชีส์ได้มากขึ้นในสถานที่ที่สัตว์เหล่านี้มาอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น ซึ่งไวรัสใน genus Alphacoronavirus และ genus Betacoronavirus มีบรรพบุรุษร่วมกัน คือ ค้างคาว

ส่วนไวรัสใน genus *Gammacoronavirus* และ genus *Deltacoronavirus* มีบรรพบุรุษร่วมกัน คือนก [18] [ดังภาพประกอบ 4]



ภาพประกอบ 4 ไดอะแกรมแสดงการจัดจำแนกและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโคโรนา

การระบาดของไวรัสโรโคนาสายพันธุ์ใหม่ 2019

มีสมมุติฐานว่าไวรัสอาจจะมีแหล่งต้นกำเนิดมาจากค้างคาวและกลายพันธุ์เมื่อผ่านสัตว์ตัวกลางกลายเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ก่อโรคในคนในที่สุด ซึ่งปัจจุบันเป็นการแพร่ระหว่างคนสู่คนเป็นหลัก จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาที่ตำแหน่ง S protein ของไวรัส SARS-CoV-2 พบว่ามีความสามารถในการจับกับ hACE2 receptor ได้ดีกว่า S protein ของ SARS-CoV-1 มากถึง 10-20 เท่า จึงแสดงให้เห็นว่า SARS-CoV-2 มีความสามารถส่งผ่านจากคนสู่คนได้ง่ายกว่า จึงส่งผลให้เกิดการระบาดแบบวงกว้างกว่า และควบคุมได้ยากกว่า [19]

เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อผ่านทางเดินหายใจและสารคัดหลั่ง อาทิเช่น การไอ จาม จะมีละอองฝอย (droplet) น้ำมูก น้ำลาย และเสมหะของผู้ติดเชื้อ หรือทางการสัมผัสสิ่งของที่ปนเปื้อนเชื้อ นำเชื้อไปเข้าสู่ร่างกายทาง จมูก ปาก และเยื่อตา นอกจากนี้ไวรัสยังสามารถติดต่อผ่านทาง fecal-oral transmission ได้ จากงานวิจัยหลายๆ ฉบับทำการตรวจยืนยันโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ในสารคัดหลั่งตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายดังนี้ ตรวจพบเชื้อใน sputum ร้อยละ 97.9, nasopharyngeal swab ร้อยละ 88.6, throat swab ร้อยละ 60, oral swab ร้อยละ 46.7, serum ร้อยละ 12.3, stool ร้อยละ 70.8, rectal swab ร้อยละ 17.4, และ urine ไม่พบเชื้อ [20] ต่อมา มีรายงานว่าผู้ป่วยโรค COVID-19 ตรวจพบเชื้อใน conjunctival swab ร้อยละ 1.1 [21]

เมื่อได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายมีระยะฟักตัวของโรคอยู่ในช่วง 2-14 วัน เฉลี่ยอยู่ที่ 5.2 วัน เป็นเหตุผลให้ผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการของโรคหรืออยู่ในระยะฟักตัวสามารถแพร่เชื้อไวรัสให้กับผู้อื่นได้ และให้ผู้สัมผัสโรคต้องกักตัว 14 วัน ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยการตรวจหาปริมาณไวรัสจาก throat swab

และ nasal swab ของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส COVID-19 จำนวน 18 ราย พบว่ามีผู้ป่วยติดเชื้อ 1 รายที่ไม่แสดงอาการของโรค แต่ตรวจพบว่ามีปริมาณไวรัสสูงเท่าๆ กับผู้ป่วยติดเชื้อที่แสดงอาการ อีก 17 ราย ปัจจัยที่มีผลต่อผู้ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการ อาจจะขึ้นอยู่กับสุขภาพของผู้ที่ติดเชื้อ ช่องทางที่เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย เช่น หากเข้าสู่ปอดโดยตรง ทางจมูก และทางปาก จะทำให้เกิดโรคเร็วกว่าเชื้อโรคเข้าสู่ทางเยื่อตา หรือปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันของผู้ที่ติดเชื้อมีผลทั้งการกำจัดเชื้อ และการอักเสบทำให้เกิดอาการของโรค [4]

ลักษณะอาการทางคลินิกที่พบได้บ่อย ได้แก่ มีไข้ ไอแห้ง อ่อนเพลีย ไข้หวัด หายใจลำบาก ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ หรืออาจมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น เจ็บคอ ปวดศีรษะ หรือท้องเสีย เป็นต้น ความรุนแรงของโรคพบได้ตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงมีอาการรุนแรงขั้นเสียชีวิต ดังนี้ ผู้ป่วยมีอาการน้อย พบร้อยละ 80.9 ให้การรักษาตามอาการ และสามารถหายได้เอง ผู้ป่วยมีอาการหนักจากปอดอักเสบ หายใจลำบาก พบร้อยละ 13.8 ผู้ป่วยมีอาการขั้นวิกฤติ หายใจล้มเหลว พบร้อยละ 4.7 และผู้ป่วยเสียชีวิต พบร้อยละ 4.6 ที่สำคัญความรุนแรงของโรค อาจขึ้นอยู่กับปริมาณไวรัสที่ได้รับเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ ปัจจัยทางร่างกายของผู้ติดเชื้อ เช่น สุขภาพ โรคประจำตัว ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน และการดูแลรักษาผู้ป่วยเมื่อติดเชื้อ เป็นต้น [22, 23]

วิวัฒนาการของไวรัสโรโคนาสายพันธุ์ใหม่ 2019

การเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรม (mutation) เป็นเรื่องธรรมชาติของไวรัส แต่ด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัวของไวรัสตระกูลนี้ที่สามารถแก้ไขเบสที่ผิดพลาดได้ในขณะที่เพิ่มจำนวนในเซลล์ ซึ่งจะต่างจากไวรัส RNA ชนิดอื่นที่ไรเอ็นไซม์ RNA dependent RNA polymerase (RdRp) เหมือนกัน แต่ไม่มี proof reading activity เนื่องจาก coronavirus มีโปรตีน nsp14 ซึ่งมี exonuclease สามารถแก้ไขเบสที่ผิดพลาดจากการทำงานของเอนไซม์ RdRp ได้ (Minskaia E, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103:5108-13) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไวรัส นักไวรัสวิทยาสามารถจำแนก SARS-CoV-2 ออกเป็น clade ย่อย ๆ โดยอาศัยระบบ Global Initiative on sharing all influenza data (GISAID) เพื่อสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของเบสบนจีโนมของไวรัสเทียบกับสายพันธุ์เริ่มต้นคือ Wuhan-Hu-1 (GenBank accession number NC_045512.2) จึงสามารถจัดกลุ่มของ SARS-CoV-2 ได้ดังนี้

Clade L เป็นไวรัสสายพันธุ์เริ่มแรก (Wuhan-Hu-1-like) ที่ระบาดในเมืองอู่ฮั่น เมื่อปลายปี 2562 – กลางเดือนมกราคม 2563 จัดเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น

Clade S ในช่วงกลางเดือนมกราคมเป็นต้นมาเริ่มพบไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงตรงนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่งพร้อม ๆ กัน ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1 เบส C ที่ตำแหน่ง 8,782 เปลี่ยนเป็น T (C8782T) ซึ่งตรงกับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 76 ของโปรตีน NSP4 โดยการเปลี่ยนแปลงนี้เป็น silent mutation

คือ ไม่มีผลต่อกรดอะมิโนในตำแหน่ง S76S และ ตำแหน่งที่ 2 เบส T ที่ตำแหน่ง 28,144 เปลี่ยนเป็น C (T28144C) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้ กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 84 ของโปรตีน ORF8 เปลี่ยนจาก leucine (L) เป็น serine (S): L84S

Clade V ในเวลาต่อมา นักไวรัสวิทยาได้ค้นพบไวรัสใน Clade L มีการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรม 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1 เบส G ที่ตำแหน่ง 11,083 เปลี่ยนเป็น T (G11083T) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 37 ของโปรตีน NSP6 เปลี่ยนจาก leucine (L) เป็น phenylalanine (F): L37F ตำแหน่งที่ 2 เบส G ที่ตำแหน่ง 26,144 เปลี่ยนเป็น T (G26144T) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 251 ของโปรตีน ORF3a เปลี่ยนจาก glycine (G) เป็น valine (V): G251V

Clade G ในช่วงต้นเดือนมีนาคม ไวรัส SARS-CoV-2 โดยเฉพาะ Clade L ได้ระบาดออกนอกประเทศจีน ไปสู่ประเทศในทวีปยุโรป การศึกษาจีโนมของไวรัสที่แยกได้ในผู้ป่วยในทวีปนี้ พบการเปลี่ยนแปลง เบส A ที่ตำแหน่ง 23,403 เปลี่ยนเป็น G (A23403G) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 614 ของโปรตีน S เปลี่ยนจาก aspartate (D) เป็น glycine (G): D614G อาจส่งผลให้ไวรัสมีความสามารถในการติดเชื้อได้ดีขึ้น แต่การไม่มีผลต่อความรุนแรงของโรค และยังพบการเปลี่ยนแปลงอีก 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1 เบส C ที่ตำแหน่ง 241 เปลี่ยนเป็น T (C241T) ซึ่งเป็นส่วนของ 5'UTR, ตำแหน่งที่ 2 เบส C ที่ตำแหน่ง 3,037 เปลี่ยนเป็น T (C3037T) เป็น silent mutation ไม่มีผลต่อกรดอะมิโนในตำแหน่ง 106 (F106F) ของโปรตีน NSP3 และตำแหน่งที่ 3 เบส C ที่ตำแหน่ง 14,408 เปลี่ยนเป็น T (C14408T) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 314 ของโปรตีน NSP12b เปลี่ยนจาก proline (P) เป็น leucine (L): P314L

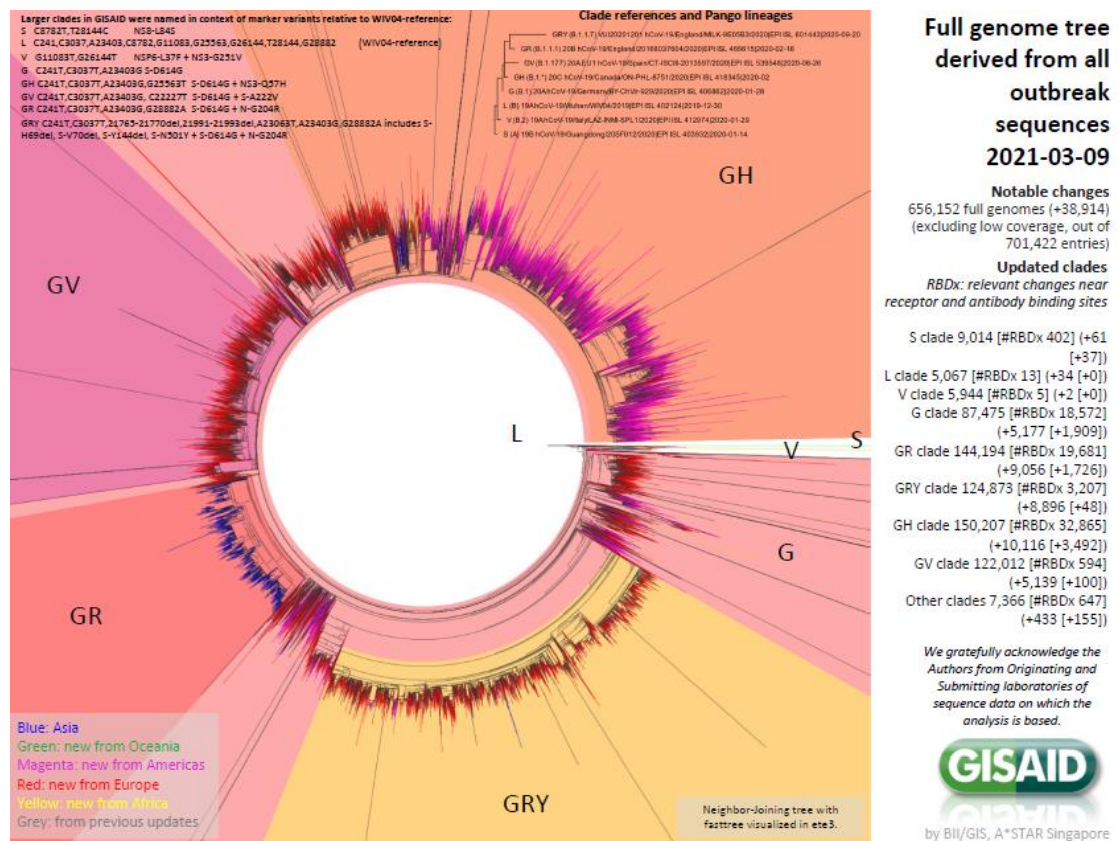
Clade GH ไวรัสใน Clade G มีการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมจากเบส G ที่ตำแหน่ง 25,563 เปลี่ยนเป็น T (G25563T) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 57 ของโปรตีน ORF3a เปลี่ยนจาก glutamine (Q) เป็น histidine (H): Q57H ซึ่งพบมาที่สูงสุดในทวีปอเมริกาเหนือ

Clade GR ในเวลาต่อมาพบว่าไวรัสใน Clade G ที่แยกได้ในทวีปยุโรป และอเมริกาใต้ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเบส 3 ตำแหน่งติดกัน ที่ตำแหน่ง 28,881-3 จาก GGG เป็น AAC ทำให้ตำแหน่งกรดอะมิโนของโปรตีน N ที่ตำแหน่ง 203-204 เปลี่ยนจาก RG เป็น KR (RG203KR)

Clade GV พบในช่วงต้นเดือนตุลาคม ไวรัสใน Clade G มีการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรม 4 ตำแหน่ง ได้แก่ C241T, C3037T, A23403G, C22227T และมีการเปลี่ยนแปลงเบสที่โปรตีน S (A222V) และพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่โปรตีน S (D614G)

Clade GRY ไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมมาโดยตลอด ล่าสุดสายพันธุ์ใหม่ที่ต้องเฝ้าระวังเป็นสายพันธุ์อังกฤษ (B.1.1.7) สายพันธุ์นี้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่สำคัญในตำแหน่ง 501 เปลี่ยนจาก asparagine เป็น tyrosine (N501Y) ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่เกาะติดกับตัวรับของเซลล์ ACE2 ทำให้ไวรัสเกาะเซลล์ได้ง่ายขึ้น จึงติดเชื้อและแพร่กระจายได้ง่าย และมีการเปลี่ยนแปลงรหัส

พันธุกรรมในตำแหน่งอื่นอีก ได้แก่ C241T, C3037T, 21765-21770del, 21991-21993del, A23063T, A23403G, G28882A และมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของโปรตีน S ได้แก่ H69del, V70del, Y144del, N501Y, D614G และมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของโปรตีน N ได้แก่ G204R Clade O (Others) ไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงเบสบนจีโนมแบบสุ่มไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ [24] [ดังภาพประกอบ 5]



ภาพประกอบ 5 การจัดกลุ่มเชื้อไวรัสโควิด-19 และตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมตามฐานข้อมูล GISAID (ข้อมูล 09 มีนาคม 2564)

การตรวจวินิจฉัยไวรัสโรโคนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 ทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 มีหลากหลายวิธี ดังนี้

1. วิธีการตรวจปอดด้วยภาพรังสี (Chest X-ray, CT- Chest) ในช่วงที่มีการระบาดหนักในประเทศไทยจีนจนการตรวจทางโมเลกุลรับไม่ไหวได้มีการแนะนำการตรวจปอดด้วยภาพเอกซเรย์คอมพิวเตอร์เพื่อการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 อาจพิจารณาเป็นส่วนประกอบของการวินิจฉัยทางการแพทย์ และเป็นอีกหนึ่งทางเลือก

2. วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส (viral isolation) ไวรัส SARS-CoV-2 จัดเป็นเชื้อก่อโรคอันตรายระดับ 3 สามารถติดต่อผ่านทางเดินหายใจ ก่อโรครุนแรงผู้ติดเชื้ออาจเสียชีวิตได้ การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ต้องทำในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 3 (BSL-3) เท่านั้น ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero E6 ได้มาจาก kidney epithelial cells และ Huh-7 ได้มาจากตับ cell lines การเพิ่มจำนวนของไวรัสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (cytopathic effect: CPE) [กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), 2020]

3. วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Serological testing) แสดงถึงหลักฐานของการติดเชื้อ และเป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีประโยชน์ในทางระบาดวิทยา สามารถใช้ประเมินผลย้อนหลังของการระบาดได้ จากงานวิจัยของ Zhang และคณะ สามารถตรวจ IgM และ IgG จำเพาะต่อเชื้อ SARS-CoV-2 จากตัวอย่าง serum ผู้ป่วยโรค COVID-19 โดยใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) อาศัยการจับกันระหว่าง antibody กับ SARS-CoV-2 Rp3 recombinant proteins [25] และงานวิจัยของ Xiang และคณะ สามารถตรวจหา anti-SARS-CoV-2 IgM และ IgG ในผู้ป่วยที่สงสัยโรค COVID-19 [26] สำหรับ COVID-19 ที่ตรวจด้วย Rapid Test จะสามารถตรวจได้หลังมีอาการป่วย 5 - 7 วัน หรือได้รับเชื้อมาแล้ว 10 - 14 วัน ดังนั้น การใช้ Rapid Test ตรวจภูมิคุ้มกัน (IgM/IgG) ในช่วงแรกของการรับเชื้อ หรือช่วงแรกที่มีอาการ ผลการตรวจจะแสดงผลบ ซึ่งไม่ได้แสดงว่าผู้ป่วยไม่ติดเชื้อ COVID-19 เนื่องจากภูมิคุ้มกันยังไม่เกิดขึ้น [27]

4. วิธีทางอณูโมเลกุล (Molecular testing)

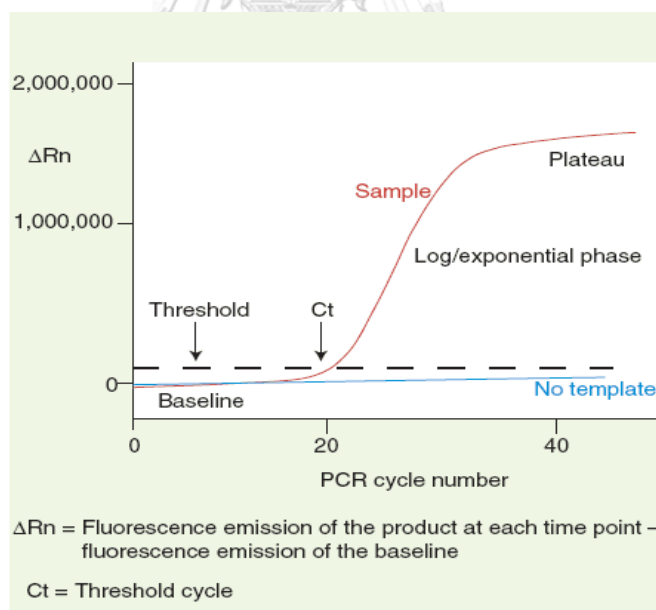
4.1 การถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (Viral sequencing) นอกจากใช้ยืนยันไวรัสแล้ว ยังช่วยให้ทราบถึงชนิดของไวรัสได้ทั้งระดับยีนและจีโนม ซึ่งการทำ Next Generation Sequencing (NGS) ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาศึกษาการระบาดในแง่ของวิวัฒนาการของไวรัส ได้แก่ การดำเนินโรค การส่งผ่านไวรัส การกลับมาติดเชื้อซ้ำอีก โดยดูลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือไม่ เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของการติดเชื้อครั้งแรกในผู้ป่วยรายเดียวกัน หรือแม้กระทั่งการติดตามการกลายพันธุ์ของไวรัส เป็นต้น รวมถึงการตรวจกรองเชื้อจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินหายใจร่วมด้วย (co-infection) [12-14, 19, 22-24]

4.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี real-time PCR เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัส ซึ่งสามารถตรวจหาระดับของ PCR product ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาได้ทันที โดยอาศัยสารเคมีที่เรืองแสง (fluorescence) ดังนั้นการทำ real-time PCR จึงเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA และสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ ได้ ซึ่งต่างจาก conventional PCR ในขั้นตอนการตรวจของ PCR product จะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดแล้ว

เทคนิค real-time PCR ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนหลักๆ ได้แก่

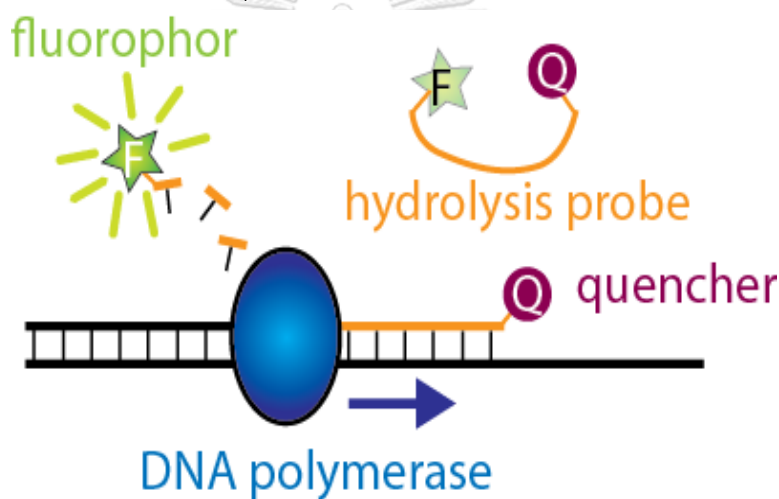
1. Linear ground phase เป็นช่วงเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา และสัญญาณเรืองแสงของ fluorescence ใน 15-20 รอบแรก ระยะเวลาที่เครื่อง real-time PCR จะมีการคำนวณ baseline ของสารเรืองแสง
2. Early exponential phase เป็นช่วงที่ระดับพลังงานของ fluorescence เพิ่มขึ้นมากกว่า background การเกิดสัญญาณเรืองแสง fluorescence ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา จะได้ค่า cycle threshold (Ct) ที่จะนำมาคำนวณ ซึ่งจะเป็นปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา
3. Log linear phase เป็นช่วงที่มีการสร้าง PCR product เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามหลักทฤษฎีของ PCR
4. Plateau phase เป็นช่วงสุดท้ายของปฏิกิริยา PCR ในช่วงนี้สารเคมีต่างๆ ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเหลือน้อยลงจนไม่สามารถนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของสารพันธุกรรมได้

ผลการวิเคราะห์ของเทคนิค real-time PCR ที่ได้จะมีลักษณะกราฟ S-shape [ดังภาพประกอบ 6] สามารถตรวจวัด PCR product ที่เกิดขึ้นจากการจับสัญญาณเรืองแสงของ fluorescence สำหรับตัวอย่างที่ไม่มีอินเป้าหมาย (no template) จะไม่มีการเพิ่มสัญญาณแสง เห็นเป็นเส้นตรงแนวระนาบ



ภาพประกอบ 6 กราฟแสดงการเพิ่มสัญญาณแสงของ reporter ที่เพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบการทำ PCR เป็นแบบทวีคูณ (exponential) มีลักษณะเป็น S-shape [แหล่งที่มา: Basic principles of Real-time Quantitative PCR]

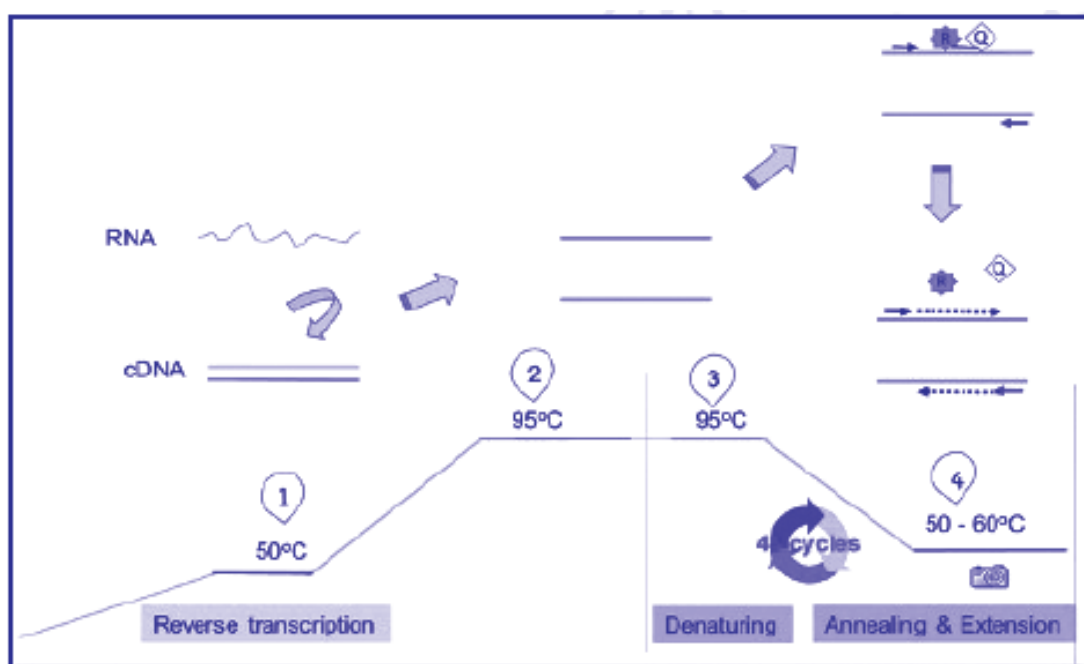
ซึ่งการทำให้เกิดการเรืองแสงนั้นสามารถทำได้โดยการใช้ Hydrolysis probe หรือ Taqman probe หรือเรียกวิธีนี้ว่า 5' nuclease assay วิธีนี้จะมีการใช้ probe เพียงเส้นเดียว โดยที่ด้านปลาย 5' ติดฉลากด้วย receptor dye ส่วนที่ด้านปลาย 3' ติดฉลากด้วย quencher dye ทั้งสองจะห่างกันไม่เกิน 5 bp เมื่อเกิดปฏิกิริยา hydrolysis แล้ว receptor dye จะถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสง จากนั้นจะมีการถ่ายทอดพลังงานผ่านไปให้กับ quencher dye ทำให้ quencher dye ดูดกลืนพลังงานแสงที่เกิดขึ้น แล้วคายพลังงานออกมาในรูปของความยาวคลื่นแสง เมื่อเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ช่วงของการสร้าง DNA สายใหม่ (extension step) probe จะถูกย่อยโดยปฏิกิริยา 5' exonuclease ของเอนไซม์ DNA polymerase ส่งผลให้ receptor dye หลุดออกจาก quencher dye จึงสามารถปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสง fluorescence [ดังภาพประกอบ 7] เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาพประกอบ 7 การทำงานของ Hydrolysis probe
[แหล่งที่มา: Basic hydrolysis probe (Taqman) PCR]

การวัดเชิงปริมาณของสารพันธุกรรมแบบ Absolute ของวิธี real-time PCR เป็นการวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่มีอยู่จริงในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจติดตามการดำเนินโรค เมื่อมีการติดเชื้อ หากต้องการให้ผลการทดสอบมีค่าคงที่ จะต้องมีการสร้าง standard curve ซึ่งจะแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างค่า Ct กับปริมาณสารพันธุกรรม แล้วนำค่า copies/ul ที่เครื่องคำนวณได้ นำมาหาปริมาณไวรัส (viral load) ที่มีในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ โดยคำนวณจากสูตร ดังนั้นปริมาณไวรัส (viral load) ที่คำนวณได้ มีหน่วยเป็น (copies/ml)

ในกรณีการตรวจเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งมีสารพันธุกรรมชนิด RNA จะมีขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็น DNA (reverse transcription; RT) ก่อนการทำ real-time PCR วิธีการตรวจจึงเป็น Real-time RT-PCR หรือ RT-qPCR ซึ่งชุดน้ำยาในปัจจุบันมีการปรับปรุงให้มีขั้นตอน RT และ PCR สามารถทำได้ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันได้ (one-step RT-PCR) [ดังภาพประกอบ 8] รวมทั้งสามารถตรวจได้หลายยีนเป้าหมายพร้อมกัน โดยทำได้จากการเลือก reporter dye ที่ให้การเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างกัน



ภาพประกอบ 8 ขั้นตอน Real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR)

1. Reverse transcription (RT): การเปลี่ยน RNA เป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอ็นไซม์ reverse transcriptase ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10-30 นาที
2. Inactivation and activation: การทำลายเอ็นไซม์ RT และกระตุ้นเอ็นไซม์ DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 2 นาที
3. PCR denaturing step: การแยก DNA จากเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวที่ 95 °C นาน 5-20 วินาที
4. PCR annealing & extension step ที่อุณหภูมิ 50-60 °C นาน 30-60 วินาที

ทำซ้ำ step 3 และ 4 เป็นจำนวน 40-45 รอบ

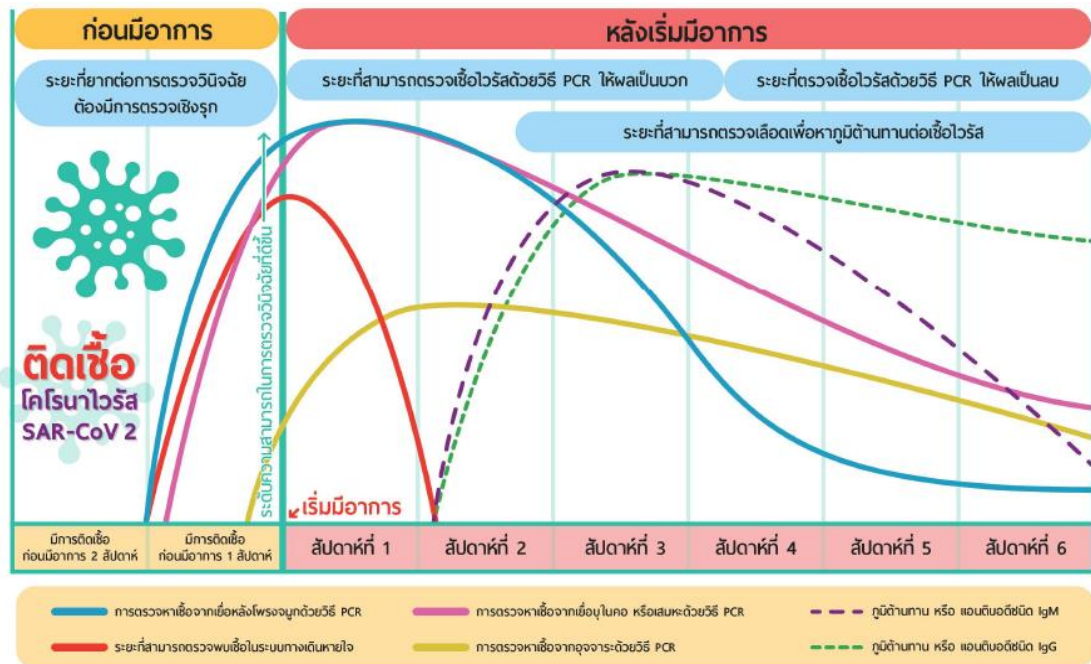
ซึ่งอุณหภูมิและช่วงเวลาของทุก step สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมขึ้นกับ primer/probe และชุดน้ำยาที่ใช้ ต้องผ่านการทดสอบและปรับแก้ (optimization) เพื่อให้ได้ อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม กรณีที่ตรวจยีนเป้าหมายมีหลายยีนที่ทำในหลอดเดียวกัน (multiplex) จะต้องทำ optimization ให้ primer/probe ของแต่ละยีนให้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเดียวกัน

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยตรงในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี real time RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่แนะนำให้ใช้ตรวจโดยองค์การอนามัยโลกและหน่วยงานหลักด้านสาธารณสุขเกือบทุกประเทศ ซึ่งมีข้อดีคือ การตรวจหาเชื้อมีความไวและมีความจำเพาะต่อเชื้อสูง สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้แม้จะมีเชื้อเพียงเล็กน้อย และสามารถตรวจพบเชื้อได้ภายใน 2-5 วันหลังจากติดเชื้อ สำหรับยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจ SAR-CoV-2 ได้แก่ non-structural (NS) เป็นยีนส่วนที่สร้างโปรตีนทำหน้าที่ในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส เช่น RNA dependent RNA polymerase (RdRp gene) บางชุดทดสอบเรียกเป็น orf1a, orf1b, orf1ab, NS1, NS2, หรือ อาจเป็น structural gene เช่น Nucleocapsid (N), Envelop (E) หรือ Spike (S) ขณะที่ไวรัสกำลังเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีการสร้างสารพันธุกรรมของไวรัส (genomic RNA) พร้อมกับสร้าง subgenomic mRNA เพื่อสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของไวรัสออกมามากมาย สำหรับชุดตรวจจับ SARS-CoV-2 ที่เป็น primer/probe มักจะถูกออกแบบในบริเวณ conserved region ซึ่งหมายถึงบริเวณจำเพาะบนยีนที่มีลำดับเบสพบได้เฉพาะ SARS-CoV-2 เท่านั้น จะไม่จับไวรัสอื่น ๆ โดยเฉพาะไวรัสที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกัน เช่น SARS, MERS, หรือ coronavirus สายพันธุ์อื่น ๆ หรือกลุ่มที่ก่อโรคในทางเดินหายใจเหมือนกัน ซึ่งยีนเดียวกันอาจถูกเลือกช่วงลำดับเบสที่ต่างบริเวณกันมาออกแบบเป็น primer/probe แต่ไม่ได้บอกว่าชุดตรวจที่ต่างยี่ห้อกัน ซึ่งใช้ยีนเป้าหมายเดียวกันจะมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เท่ากัน ในการตรวจยีนเป้าหมายของไวรัส 2-3 ยีน พร้อมกับการตรวจ Internal control เรียกว่า multiplex RT-PCR สามารถกำหนดโดยใช้สารเรืองแสงต่างชนิดกันติดที่ probe ของแต่ละยีน [Pitfall ในการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2563.] แต่ทั้งนี้เนื่องจาก COVID-19 เป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ ทางองค์การอนามัยโลกจึงได้กำหนดให้มีการตรวจยืนยันด้วยวิธี rRT-PCR จะต้องตรวจยืนยันอย่างน้อย 2 ยีนเป้าหมายที่แตกต่างกัน ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 [27]

ในปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปให้เลือกใช้เพื่อการตรวจยืนยันโรคติดเชื้อ COVID-19 มีหลากหลายยี่ห้อ และหลากหลายยี่ห้อ จากงานวิจัยของ Kasteren และคณะทำการประเมินประสิทธิภาพและเปรียบเทียบชุดตรวจสำเร็จรูป (rRT-PCR for COVID-19) จาก 7 ยี่ห้อ (Altona Diagnostics, BGI, CerTestBiotec, KH Medical, PrimerDesign, R-Biopharm AG, และ Seegene) พบว่าความไวในการตรวจจับไวรัส SARS-CoV-2 มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection; LOD) ต่างกันไม่เกิน 6 เท่าของแต่ละชุดตรวจ ที่ระดับความเชื่อมั่นไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 (LOD95 in copies/ml) และมีความจำเพาะต่อเชื้อโดยไม่เกิด cross-reactivity กับ human coronavirus สายพันธุ์อื่น ๆ ยกเว้น E-gene ที่สามารถตรวจจับ SARS-CoV-1 ได้ดังนั้นชุดตรวจสำเร็จรูปทั้ง 7 ยี่ห้อสามารถนำมาใช้ตรวจยืนยันโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ทางห้องปฏิบัติการได้

[28] ยังไร้ก็ตามยังมีองค์ความรู้เกี่ยวกับ COVID-19 ที่ทยอยเผยแพร่ออกมาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมบางส่วนมีผลกระทบต่อการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่เป็น gold standard สำหรับตรวจโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ด้วยวิธี real-time RT-PCR ทั้งในระดับประเทศและระดับสากล

ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเชื้อไวรัส COVID-19 ให้เกิดความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ 1) การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR และ 2) การตรวจหา antibodies ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้ มีหลักการเลือกเพื่อการตรวจวินิจฉัย และหลักการแปรผลที่แตกต่างกัน โดยการตรวจด้วย RT-PCR จะเลือกตรวจในกรณีที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการแสดงออกของโรคที่ชัดเจน ในการตรวจจะเก็บตัวอย่างจากการแยงจมูก และหาปริมาณไวรัส โดยแสดงผลเป็นค่า Ct วิธี RT-PCR สามารถตรวจการติดเชื้อได้ตั้งแต่วันแรกที่แสดงอาการของโรค และสามารถพบค่า Ct สูงสุดได้ภายใน 1 สัปดาห์แรก โดยมีหลักการแปรผลดังนี้ หากมีค่า Ct น้อยแสดงว่ามีปริมาณไวรัสสูง โดยพบค่า Ct น้อยกว่า 40 แสดงว่าผล RT-PCR เป็นบวก อย่างไรก็ตาม ค่า Ct จะค่อยๆ ลดลงหายไปภายในสัปดาห์ที่ 3 และแสดงผล RT-PCR เป็นลบในที่สุด ในกรณีที่ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมาก จะพบค่า Ct ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงน้อย และสามารถพบผล RT-PCR เป็นบวก คงอยู่ได้ยาวนานมากกว่า 3 สัปดาห์ ข้อควรระวังของการแปรผล RT-PCR คือ การมีผลเป็นบวกจะแสดงถึงการตรวจพบ RNA บางส่วนของไวรัสเท่านั้น จึงไม่ควรนำผล RT-PCR เพื่อบ่งบอก หรือยืนยันถึงการที่ไวรัสยังคงอยู่ หรือหายไป สำหรับวิธีการตรวจหา antibodies จะเหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรครมาแล้ว 3-4 สัปดาห์ ดังนั้นการตรวจหา antibodies จะต้องทราบ onset ของการเกิดอาการที่ชัดเจน หากมีการติดเชื้อจะพบการเพิ่มขึ้นของ IgM และ IgG ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย โดย IgM จะลดลงจนมีระดับต่ำมากได้ในสัปดาห์ที่ 5 หลังจากแสดงอาการของโรค และจะตรวจไม่พบในที่สุด ในระยะนี้อาจยังสามารถตรวจพบ IgG ได้นานถึงสัปดาห์ที่ 7 หลังจากแสดงอาการของโรค [ดังภาพประกอบ 9]



ภาพประกอบ 9 เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ในระยะต่าง ๆ
และหลักการแปลผลการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID -19 จะต้องเลือกวิธีการตรวจวินิจฉัย และวิธีการแปลผลให้เหมาะสมกับการแสดงอาการของโรค, onset ของการแสดงอาการของโรคที่ชัดเจน และระดับความรุนแรงของโรค ในผู้ป่วยเฉพาะราย [29]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้เป็นตัวอย่างระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ Nasopharyngeal swab + throat swab (NT), Nasal swab + throat swab (NST), Sputum (SP) และ Endotracheal aspirate (ETA) ที่ผ่านการสกัดสารพันธุกรรมเป็น nucleic acid แล้ว ซึ่งเหลือจากงานบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ของศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวน 111 ตัวอย่าง (ของผู้ป่วย COVID-19 10 ราย) ในช่วงเดือนมีนาคม - เมษายน ในปี พ.ศ. 2563 ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ได้รับอนุญาตจากผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และงานวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (COA No.972/2020, IRB No. 583/63)

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับสกัดสารพันธุกรรม (nucleic acid)
 - NucliSENS Lysis Buffer (bioMerieux)
 - NucliSENS extraction kit (bioMerieux) ประกอบด้วย
 - Magnetic Silica
 - Wash Buffers 1, 2 and 3
 - Eluent buffer
 - MagDEA® Dx reagents (Precision System Science, Chiba, Japan)
2. สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี real time qRT-PCR
 - SuperScript III One-Step RT-PCR system with platinum Taq DNA polymerase Kit (Invitrogen) ประกอบด้วย
 - 2X Reaction Mix (containing 0.4 mM of each dNTP, 3.2 mM MgSO₄)
 - SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix
 - Magnesium Sulfate (MgSO₄)
 - Specific primers ประกอบด้วย forward primers และ reverse primers
 - Specific probe
 - DNase - RNase free water

3. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ gel electrophoresis

- GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas Cat no. SM0321)
- Agarose, Low EEO, Molecular Biology grade (Research Organics, Cat no. 1170A)
- 1x Tris borate buffer (1xTBE)
- GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)

4. สารเคมีสำหรับทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

- NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit (Thermo Fisher Scientific UK Ltd.)

5. สารเคมีสำหรับการเตรียม positive control/standard curve

- Oligonucleotide synthetic of genomic RNA (gBlocks® Gene Fragment)
- Oligonucleotide synthetic of subgenomic RNA leader (gBlocks® Gene Fragment)

6. โปรแกรมสำหรับ Bioinformatics

- Chromas Lite (version 2.1)
- Clustal X (version 2.1)
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) version BLASTN 2.11.0.

7. วัสดุและอุปกรณ์ ที่ใช้สำหรับงานวิจัย

- Microtube: 0.1 ml, 0.6 ml และ 1.5ml (AxyGen Scientific)
- Pipette tip: 10 ul, 20ul, 200ul และ 1000ul (AxyGen Scientific)
- Glassware: Laboratory Bottle with PP-Screw cap, 1000 ml และ Cylinder
- Centrifuge
- Refrigerated microcentrifuge
- Spins down droplets
- Vortex mixer
- Thermomixer (eppendorf)
- -80 °C freezer
- -20 °C freezer
- Laboratory Refrigerator 2-8 °C
- PCR cabinet
- Class II Biological safety cabinet
- Real time PCR (Rotor-Gene Q) Instrument
- NUCLISENS MINIMAG instrument
- MagLEAD 12gC

- Electrophoresis chamber set (Bio-RAD)
- Gel Doc 1000 UV transilluminator (Bio-RAD)
- Molecular biology transilluminator
- Heater block
- Microwave
- Biohazard waste Bag
- Biohazard trash garbage bin
- Biohazard waste container

วิธีดำเนินการวิจัย

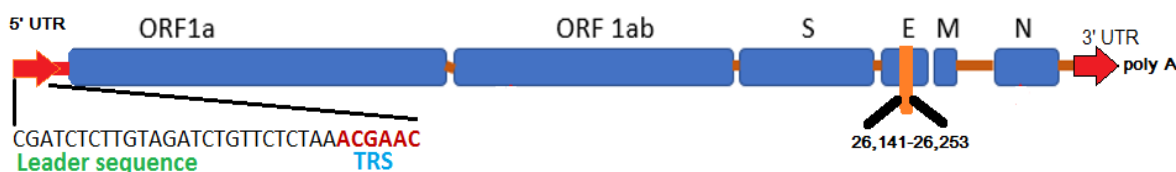
1. ชุดตรวจจับสารพันธุกรรม primers และ probe ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้จากการทบทวนวรรณกรรมที่มีการรายงานขององค์การอนามัยโลก และในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 ชุด primers และ probe ที่ใช้ในการตรวจจับ genomic RNA (พัฒนาโดย corman et al. charité virology berlin germany, 2020-V.2) [30]

1.2 ชุด primers และ probe ที่ใช้ในการตรวจจับ subgenomic RNA leader (พัฒนาโดย wölfel r et al. nature 2020 april 1) [10]

ตาราง 2 รายละเอียดของ primers และ probe ที่จำเพาะต่อยีน E ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2

Name	Sequence (5'- 3')	Length	Product size	Target	Ref.	
SgLead_F	CGATCTCTT GTAGATCTGTTCTC	23 bp.	171bp.	Sub-genomic RNA leader	[10]	
Probe-E	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	26 bp.			[30]	
E_Sarbeco_R	ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	22 bp.				
E_Sarbeco_F	ACA GGTACGTTA ATA GTT AAT AGC GT	26 bp.	113 bp.	genomic RNA	[30]	
Probe-E	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	26 bp.				
E_Sarbeco_R	ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	22 bp.				



ภาพประกอบ 10 ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของ leader primer และ E gene primer ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2

[แหล่งที่มา: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005883.g001>]

2. การเตรียม positive control/standard curve

2.1 การเตรียม positive control ที่ใช้ควบคุมปฏิกิริยาบวกสำหรับ genomic RNA (gBlocks® Gene Fragment) ให้บริษัทสังเคราะห์ oligonucleotide เป็น double-stranded DNA ขนาดความยาว 131 bp. อยู่ในรูปแบบเป็นผงแห้ง (lyophilized) นำมาละลายกับ DNase - RNase free water จะได้ความเข้มข้นเป็น 10 ng/ul

การคำนวณหาค่า copy number โดยใช้โปรแกรม copy number calculator for real time PCR [ดังภาพประกอบ 11]

-ทำสารละลายเข้มข้นให้เจือจางลง โดยจำนวนโมลตัวละลายก่อนและหลัง การทำให้เจือจางจะมีค่าเท่าเดิม โดยใช้สูตร $C1V1 = C2V2$ จะได้ความเข้มข้นเป็น 1×10^{10} copies/ul

-ทำ 10 fold serial dilution จากความเข้มข้นเป็น $1 \times 10^{10} - 1$ copies/ul ก่อนนำไปทดสอบ

Calculate copy number based on:

Length
Mass

Template: **Double Stranded DNA**

Amount of DNA: ng

Length of DNA: bases or base pairs

The number of copies is:

6.965×10^{10}

Template Options: dsDNA ssDNA ssRNA

ภาพประกอบ 11 โปรแกรมที่ใช้สำหรับการคำนวณค่า copy number calculator for genomic RNA real time PCR [แหล่งที่มา: scienceprimer.com]

2.2 การเตรียม positive control ที่ใช้ควบคุมปฏิกิริยาบวกสำหรับ subgenomic RNA leader (gBlocks® Gene Fragment) ให้บริษัทสังเคราะห์ oligonucleotide เป็น double-stranded DNA ขนาดความยาว 171 bp. อยู่ในรูปแบบเป็นผงแห้ง (lyophilized) นำมาละลายกับ DNase - RNase free water จะได้ความเข้มข้นเป็น 10 ng/ul การคำนวณหาค่า copy number โดยใช้โปรแกรม copy number calculator for real time PCR [ดังภาพประกอบ 12]

-ทำสารละลายเข้มข้นให้เจือจางลง โดยจำนวนโมลตัวละลายก่อนและหลัง การทำให้เจือจางจะมีค่าเท่าเดิม โดยใช้สูตร $C1V1 = C2V2$ จะได้ความเข้มข้นเป็น 1×10^{10} copies/ul

-ทำ 10 fold serial dilution จากความเข้มข้นเป็น $1 \times 10^{10} - 1$ copies/ul ก่อนนำไปทดสอบ

Calculate copy number based on:

Length **Mass**

Template: **Double Stranded DNA**

Amount of DNA: 10 ng

Length of DNA: 171 bases or base pairs

The number of copies is:

5.336×10^{10}

Template Options: dsDNA ssDNA ssRNA

ภาพประกอบ 12 โปรแกรมที่ใช้สำหรับการคำนวณค่า copy number calculator for subgenomic RNA leader real time PCR [แหล่งที่มา: scienceprimer.com]

3. การทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ genomic RNA และ subgenomic RNA leader ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time qRT-PCR

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการปรับความเหมาะสมของสารเคมีที่ใช้ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยได้ทำการปรับความเข้มข้นของ primer (primer concentration) และปรับความเข้มข้นของ probe (probe concentration) นอกจากนี้ยังได้ปรับความเหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน

การทำปฏิกิริยา nomoplex real-time qRT-PCR ดังนั้นความเหมาะสมของสารเคมีและอุณหภูมิที่ใช้นั้น พิจารณาจากค่า Ct และรูปกราฟ (s curve) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา real-time qRT-PCR

- นำ positive control ที่เตรียมไว้ ใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาบวก และ DNase - RNase free water ใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ทดสอบด้วยวิธี real-time qRT-PCR
- การเตรียม Master Mix มีการผสมสารละลายเคมีต่างๆ [ดังตาราง 3 และ 4]

โดยใช้ชุดน้ำยา Superscript III one-step RT-PCR system with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, Darmstadt, Germany)

ตาราง 3 ส่วนผสมสำหรับการตรวจ genomic RNA real-time qRT-PCR

No.	Master Mix	1x (ul)	Rx (ul)
1	2x Reaction mix	12.5	
2	MgSO ₄ (50mM)	0.4	
3	E_Sarbeco_F (10uM)	1	
4	E_Sarbeco_R (10uM)	1	
5	Probe_E (10uM)	0.5	
6	Superscript III Taq enzyme mix	1	
7	DNase-RNase free water	3.6	
8	RNA template	5	

ตาราง 4 ส่วนผสมสำหรับการตรวจ subgenomic RNA leader real-time qRT-PCR

No.	Master Mix	1x (ul)	Rx (ul)
1	2x Reaction mix	12.5	
2	MgSO ₄ (50mM)	0.4	
3	SgLead_F (10uM)	1	
4	E_Sarbeco_R (10uM)	1	
5	Probe_E (10uM)	0.5	
6	Superscript III Taq enzyme mix	1	
7	DNase-RNase free water	3.6	
8	RNA template	5	

จากนั้นเติม master mix 20 ul ใส่ในหลอด 0.1 ml เติม RNA template 5 ul แล้วนำลงในเครื่อง Real time PCR (Rotor-Gene Q) [ดังตาราง 5]

ตาราง 5 รายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม Real-time qRT-PCR

Step	Temperature °C	Time
Reverse Transcription	55	20 min
Initial denaturation	95	3 min
Repeat step for 45 cycles, by followed:		
Denature	95	15 sec
Annealing	58	30 sec
Extension	72	30 sec

ผลการตรวจวิเคราะห์ พิจารณาจากกราฟที่เป็น s-curve และค่า cycle threshold (Ct)

4. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ genomic RNA และ subgenomic RNA leader ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time qRT-PCR

4.1 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) สำหรับชุด primers และ probe ที่ใช้ในการตรวจ genomic RNA ได้จากการทบทวนวรรณกรรมของงานวิจัยก่อนหน้า (corman et al. charité virology berlin germany, 2020-V.2) [30]

4.2 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) สำหรับชุด primers และ probe ที่ใช้ในการตรวจ subgenomic RNA leader

นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัด DNA ออกจากเจล (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up) ทำการถอดรหัสพันธุกรรม (sequence)

5. การทดสอบความไว (Sensitivity) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ genomic RNA และ subgenomic RNA leader ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time qRT-PCR

5.1 การหาปริมาณไวรัสที่น้อยที่สุด (Limit of detection; LOD) ที่ชุด primers/probe ของแต่ละชุดสามารถตรวจเชื้อได้ โดยนำ oligonucleotide synthesized ที่ทราบ copies number เจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10 fold serial dilution) เริ่มจากความเข้มข้นเป็น $1 \times 10^6 - 1$ copies/ul ทำทั้งหมด 7 dilution จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี real time qRT-PCR

5.2 กำหนด standard curve เพื่อใช้สำหรับอ้างอิงการเปรียบเทียบหาปริมาณไวรัส (viral load)

6. การทดสอบประสิทธิภาพ (Performance evaluation) ของวิธี real-time qRT-PCR สำหรับการตรวจวิเคราะห์ genomic RNA และ subgenomic RNA leader ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2

การทดสอบประสิทธิภาพ จะเป็นการตรวจหาเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่สามารถจำแนกสถานะของเชื้อไวรัสระหว่าง active viral replication (subgenomic RNA leader) กับ inactive viral replication (genomic RNA) แบบเชิงปริมาณ ด้วยวิธี real-time qRT-PCR โดยทดสอบกับ nucleic acid จำนวน 111 ตัวอย่าง

7. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

7.1 วิเคราะห์ผลจากการตรวจด้วยวิธี real time qRT-PCR โดยการใช้ primer/probe ของแต่ละชุด สำหรับจำแนกสถานะของเชื้อไวรัสระหว่าง active viral replication (subgenomic RNA leader) กับ inactive viral replication (genomic RNA)

7.2 วิเคราะห์ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ในด้านความแม่นยำ (Accuracy), ระดับความไว (Sensitivity) และปริมาณไวรัส (viral load) หลังการรักษา โดยพิจารณาจากแนวโน้มการลดลงของ genomic RNA และการตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader ในที่สุด

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ genomic RNA และ subgenomic RNA leader ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time qRT-PCR

โดยทดสอบสถานะอุณหภูมิสำหรับการตรวจด้วยวิธี Real time qRT-PCR ตามชุดน้ำยา Superscript III one-step RT-PCR system with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, Darmstadt, Germany) และศึกษาจากงานวิจัยก่อนหน้า [10,30] นอกจากนี้ได้มีการปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ทั้ง 2 ชุดตรวจ ให้เท่ากัน ผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมของวิธี real time qRT-PCR (monoplex) ในการทำปฏิกิริยาตรวจจับ genomic RNA และปฏิกิริยาตรวจจับ subgenomic RNA leader สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้สภาวะอุณหภูมิเดียวกันได้ และพร้อมกันตรวจวัดปริมาณไวรัส (viral load)

2. ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ genomic RNA และ subgenomic RNA leader ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time qRT-PCR

ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุด primers/probe ที่ใช้ในการตรวจจับ genomic RNA ได้ผ่านการทดสอบแล้ว โดยอ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้า [30]

ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุด primers/probe ที่ใช้ในการตรวจจับ subgenomic RNA leader ได้จากการถอดรหัสพันธุกรรม (sequence) ประกอบด้วยส่วนของ leader sequence หรือ transcriptional regulatory sequences (TRS) และส่วนที่เป็นจีโนมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 [ดังภาพประกอบ 13 และ 14]

>subgenomic RNA leader_ sequence

CGATCTCTTG TAGATCTGTTCTCTAAACGAAC TTATGTACTCATTTCGTTTCGGAAGAG
ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTTCGTGGTATTCTTGCT
AGTTACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCGATGGTGTGCGTACTGCTGCAATAT*

ภาพประกอบ 13 subgenomic RNA leader sequence

*ตัวอักษรสีน้ำเงิน: Leader sequence (primer-F) ตัวอักษรสีแดง: TRS, ตัวอักษรสีดำ: nucleotides of SARS CoV-2 (part of the E gene), ตัวอักษรสีดำ underline: probe และตัวอักษรสีเขียว: primer-R

เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST (Criteria: identity score \geq 98 % with SARS CoV-2 genome)

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/IND/GBRC103/2020, complete genome

Sequence ID: [MT509959.1](#) Length: 29796 Number of Matches: 2

Range 1: 26191 to 26312 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
226 bits(122)	2e-55	122/122(100%)	0/122(0%)	Plus/Plus
Query 27	ACGAACCTATGACTCATTTCGTTTCGGAAGAGACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTAC	86		
Sbjct 26191	ACGAACCTATGACTCATTTCGTTTCGGAAGAGACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTAC	26250		
Query 87	TTCCTTTTCTTGCTTTTCGTTGTTTCTTCTAGTTACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTC	146		
Sbjct 26251	TTCCTTTTCTTGCTTTTCGTTGTTTCTTCTAGTTACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTC	26310		
Query 147	GA 148			
Sbjct 26311	GA 26312			

Range 2: 2 to 35 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)









Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
63.9 bits(34)	2e-06	34/34(100%)	0/34(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGATCTCTTGATGATCTGTTCTCTAAACGAACCT	34		
Sbjct 2	CGATCTCTTGATGATCTGTTCTCTAAACGAACCT	35		

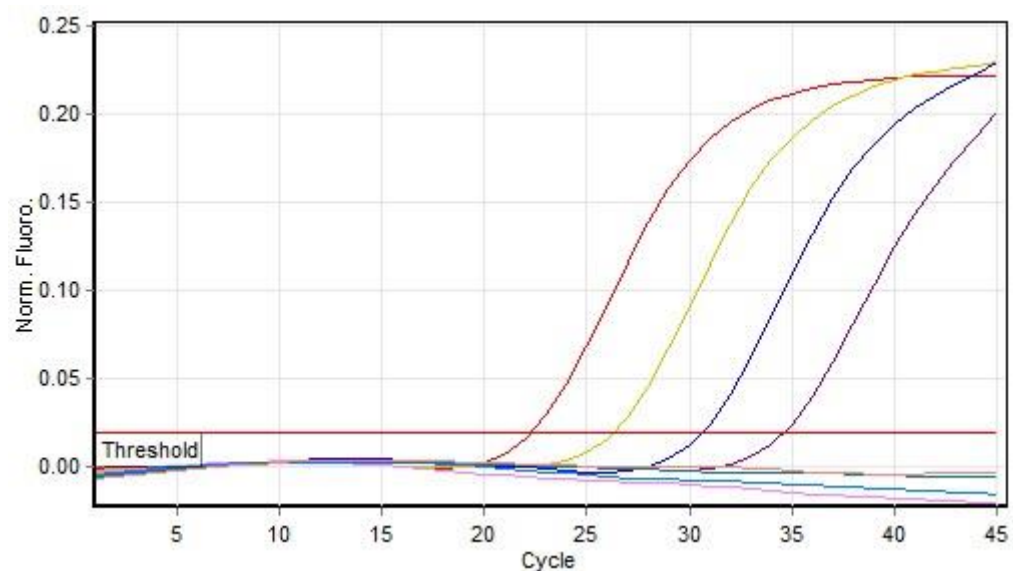
ภาพประกอบ 14 การวิเคราะห์ subgenomic RNA leader sequence ด้วยโปรแกรม BLAST

3. ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ genomic RNA และ subgenomic RNA leader ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real time qRT-PCR

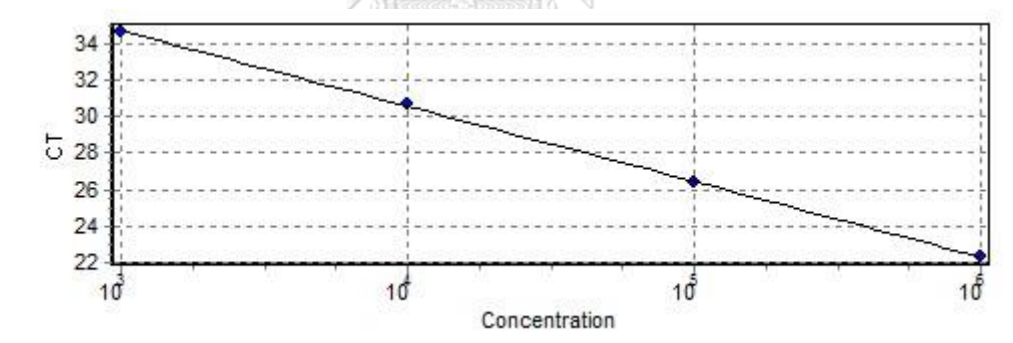
ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) สำหรับตรวจวิเคราะห์ genomic RNA real time qRT-PCR [ดังตาราง 6 และ ภาพประกอบ 15-16]

ตาราง 6 ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) genomic RNA real time qRT-PCR

Color	oligonucleotide synthesized	10 fold dilution	Ct	Standard	Cal. (Copies/ul)
	gSARS-CoV2 1*10 ⁶	1:10 ⁶	22.33	1.00E+06	9.88E+05
	gSARS-CoV2 1*10 ⁵	1:10 ⁵	26.34	1.00E+05	1.05E+05
	gSARS-CoV2 1*10 ⁴	1:10 ⁴	30.68	1.00E+04	9.37E+03
	gSARS-CoV2 1*10 ³	1:10 ³	34.64	1.00E+03	1.03E+03
	gSARS-CoV2 1*10 ²	1:10 ²	-	1.00E+02	-
	gSARS-CoV2 10	1:10 ¹	-	1.00E+01	-
	gSARS-CoV2 1	1:10 ⁰	-	1.00E+00	-
	Negative control	-	-	-	-











ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงผลการทดสอบความไว (Sensitivity) genomic RNA

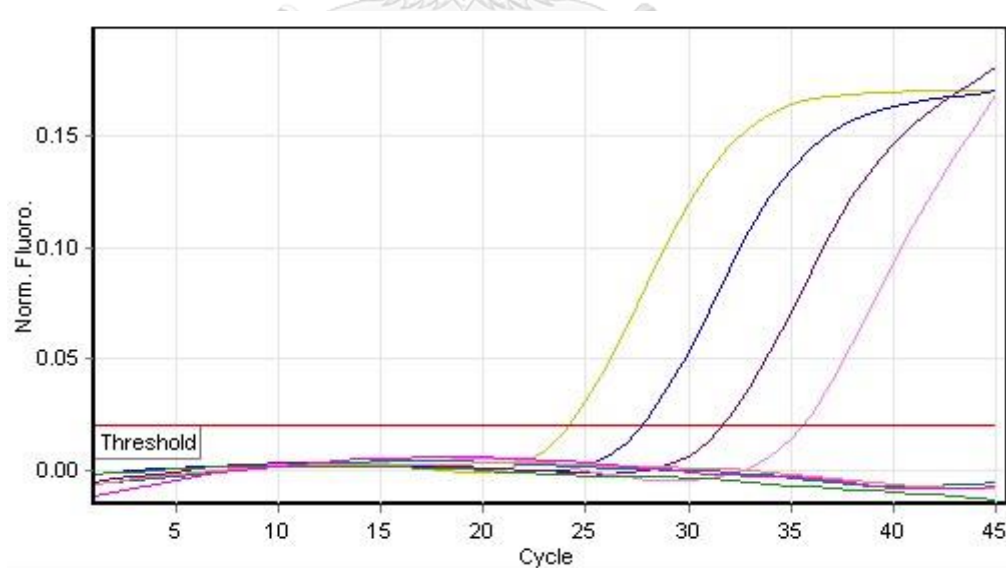


ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงค่า standard curve ระหว่างค่า Ct และ concentration genomic RNA

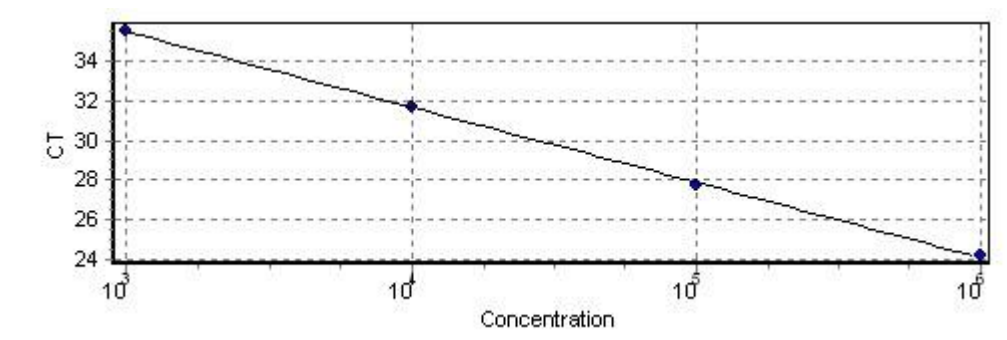
ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ subgenomic RNA leader real time qRT-PCR [ดังตาราง 7 และ ภาพประกอบ 17-18]

ตาราง 7 ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) subgenomic RNA leader real time qRT-PCR

Color	oligonucleotide synthesized	10 fold dilution	Ct	Standard	Cal. (Copies/ul)
	sg SARS-CoV-2 1*10 ⁶	1:10 ⁶	24.17	1.00E+06	9.42E+05
	sg SARS-CoV-2 1*10 ⁵	1:10 ⁵	27.75	1.00E+05	1.08E+05
	sg SARS-CoV-2 1*10 ⁴	1:10 ⁴	31.66	1.00E+04	1.02E+04
	sg SARS-CoV-2 1*10 ³	1:10 ³	35.57	1.00E+03	9.61E+02
	sg SARS-CoV-2 1*10 ²	1:10 ²	-	1.00E+02	-
	sg SARS-CoV-2 10	1:10 ¹	-	1.00E+01	-
	sg SARS-CoV-2 1	1:10 ⁰	-	1.00E+00	-
	Negative control	-	-	-	-



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงผลการทดสอบความไว (Sensitivity) subgenomic RNA leader



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงค่า standard curve ระหว่างค่า Ct และ concentration subgenomic RNA leader

ผลการวิเคราะห์

จากการทดสอบโดยใช้ oligonucleotide synthesized พบว่าวิธี real time qRT-PCR มีความไวในการตรวจวัดปริมาณไวรัสเท่ากับ 1,000 copies/ul แสดงว่าการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 สามารถตรวจได้ทั้ง genomic RNA และ subgenomic RNA leader ด้วยวิธี real time qRT-PCR (monoplex) ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 copies/ul ขึ้นไป ($\geq 1,000$ copies/ul) และมีความไวสูงเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 เมื่อเทียบกับชุดตรวจสำเร็จรูป (limit of detection 1,000 copies/ul)

4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพ (Performance evaluation) ของวิธี real-time qRT-PCR สำหรับการตรวจวิเคราะห์ genomic RNA และ subgenomic RNA leader ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้คัดเลือกตัวอย่างของผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยมีการเก็บตัวอย่างแบบ Follow up ตั้งแต่วันที่ตรวจพบเชื้อจนกระทั่งตรวจไม่พบเชื้อ 2 - 4 วันต่อเนื่อง จำนวน 111 ตัวอย่าง (ของผู้ป่วย COVID-19 10 ราย) ประกอบด้วย nasopharyngeal swab + throat swabs (NT) จำนวน 19 ตัวอย่าง, nasal swab + throat swabs (NST) จำนวน 8 ตัวอย่าง, sputum (SP) จำนวน 77 ตัวอย่าง และ Endotracheal aspirate (ETA) จำนวน 7 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์พบว่า subgenomic RNA leader สามารถตรวจพบได้นาน 4 วัน จนถึง 15 วัน ในขณะที่ genomic RNA ยังตรวจพบได้นานถึง 24 วัน [ดังตาราง 8] ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าในช่วงระยะเวลาเริ่มต้นของการติดเชื้อมีการตรวจพบ subgenomic RNA leader สัมพันธ์กับปริมาณ genomic RNA ที่มีมาก หรือ ปริมาณไวรัส (viral load) $\geq 1E+05$ copies/ml หรือ $\geq 100,00$ copies/ml [ดังภาพประกอบ 19] โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson Correlation) ที่ 0.836 จากนั้นหลังจากตรวจไม่พบ

subgenomic RNA leader ก็ได้ตรวจติดตามผู้ป่วยต่อไปจนกระทั่งตรวจไม่พบ genomic RNA 2-4 วันต่อเนื่อง จึงพบว่ามีผู้ป่วย COVID-19 จำนวน 2 จาก 10 ราย ที่สามารถตรวจพบ subgenomic RNA leader ได้อีกครั้ง หลังจากที่ไม่พบแล้ว 2-8 วันต่อเนื่อง [ดังตาราง 8]

ผู้ป่วยรายที่ 7 (Case #7) มีการตรวจพบ subgenomic RNA leader ได้นานถึง 11 วัน ต่อมาวันที่ 13 และ 14 ตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader เป็นเวลา 2 วันต่อเนื่อง หลังจากนั้น วันที่ 15 ตรวจพบ subgenomic RNA leader อีกครั้ง ต่อมาวันที่ 18, 21 และ 23 ก็ตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader แล้ว ซึ่งผู้ป่วยรายนี้ยังคงตรวจพบ genomic RNA ได้นาน 18 วัน

ผู้ป่วยรายที่ 8 (Case #8) พบว่า subgenomic RNA leader ให้ผลบวกจนถึงวันที่ 4 แล้ว ให้ผลลบในวันที่ 5, 6, 7, 8, 10 และ 12 ซึ่งเป็นเวลา 8 วันต่อเนื่อง จากนั้นวันที่ 14 ตรวจพบ subgenomic RNA leader อีกครั้ง ต่อมาวันที่ 16 ตรวจไม่พบทั้ง subgenomic RNA leader และ genomic RNA



ตาราง 8 ผลการทดลองการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19

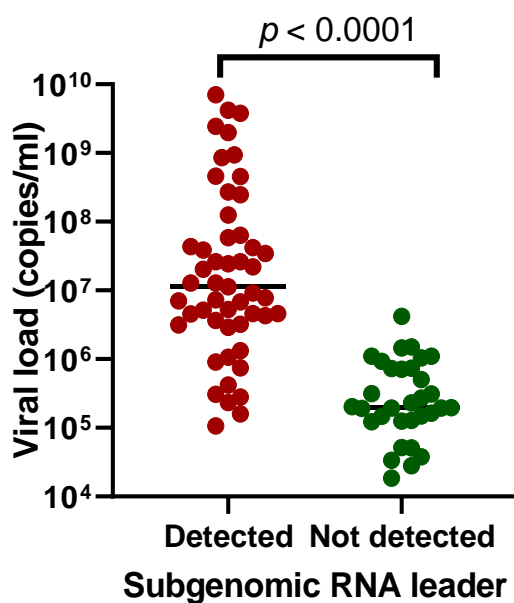
* ORF 1ab gene ข้อมูลนี้ได้มาจากการบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ของศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ นำมาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการแปลผล เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ต้องตรวจร่วมกัน 2 ยีนที่แตกต่างกัน ตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก

Days (specimens)	ORF1ab gene*	genomic RNA		subgenomic RNA leader	
	Ct	Ct	Copies/ml	Ct	Copies/ml
Case #1					
01 (SP)	20.04	22.53	2.71E+08	31.76	5.13E+05
02 (SP)	20.47	22.71	2.46E+08	30.71	9.69E+05
03 (SP)	21.33	27.99	1.29E+07	37.91	1.25E+04
05 (SP)	33.16	35.43	2.04E+05	Not detected	Not detected
06 (SP)	29.59	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
07 (NT)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
08 (NT)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Case #2					
01 (SP)	23.50	26.77	2.20E+07	30.50	1.45E+06
04 (SP)	26.92	29.61	4.54E+06	33.88	1.89E+05
05 (SP)	26.39	26.46	2.63E+07	34.72	1.14E+05
08 (SP)	26.65	28.82	7.05E+06	37.71	1.86E+04
09 (SP)	31.79	35.61	1.60E+05	36.02	5.18E+04
10 (SP)	28.08	32.24	1.04E+06	Not detected	Not detected
11 (SP)	33.25	35.27	1.94E+05	Not detected	Not detected
13 (SP)	30.38	35.56	1.64E+05	Not detected	Not detected
14 (SP)	31.47	35.26	1.94E+05	Not detected	Not detected
18 (SP)	31.22	35.75	1.48E+05	Not detected	Not detected
23 (SP)	34.23	37.64	5.15E+04	Not detected	Not detected
25 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
26 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
27 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
28 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected

Case #3					
01 (NT)	12.89	14.96	7.02E+09	22.64	4.02E+08
08 (NT)	19.01	23.53	5.87E+07	32.20	1.25E+06
10 (ETA)	25.78	27.15	7.81E+06	34.72	2.73E+05
12 (SP)	24.88	26.86	9.21E+06	36.92	7.21E+04
13 (SP)	25.57	27.89	5.16E+06	37.66	4.61E+04
14 (SP)	30.42	34.84	1.07E+05	37.63	4.70E+04
15 (SP)	30.43	30.72	1.07E+06	38.62	2.59E+04
17 (SP)	32.09	34.56	1.25E+05	Not detected	Not detected
18 (SP)	28.53	30.66	1.11E+06	Not detected	Not detected
20 (SP)	29.48	31.41	7.29E+05	Not detected	Not detected
21 (SP)	31.71	36.72	3.76E+04	Not detected	Not detected
22 (SP)	22.90	28.27	4.18E+06	Not detected	Not detected
23 (SP)	26.19	30.98	9.24E+05	Not detected	Not detected
24 (SP)	28.41	30.12	1.50E+06	Not detected	Not detected
25 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
26 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
28 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Case #4					
01 (NST)	27.60	31.65	4.20E+05	34.86	1.05E+05
07 (NT)	26.80	32.70	2.34E+05	35.82	5.84E+04
08 (ETA)	27.57	32.20	3.09E+05	38.47	1.18E+04
09 (SP)	29.01	30.61	7.48E+05	39.57	6.06E+03
10 (SP)	31.06	32.43	2.71E+05	Not detected	Not detected
11 (SP)	33.71	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
12 (SP)	35.70	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
13 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
14 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Case #5					
01 (SP)	15.16	19.29	9.43E+08	25.83	3.40E+07
02 (SP)	11.89	16.80	3.78E+09	24.33	8.41E+07
03 (NT)	18.79	22.91	1.25E+08	29.15	4.56E+06
04 (SP)	20.22	28.83	4.61E+06	36.93	4.16E+04
06 (NT)	34.97	27.21	1.13E+07	35.11	1.25E+05
07 (SP)	22.52	29.67	2.89E+06	38.14	2.00E+04

08 (SP)	24.87	29.25	3.64E+06	39.74	7.61E+03
10 (SP)	24.07	32.11	7.36E+05	Not detected	Not detected
11 (SP)	30.14	35.34	1.22E+05	Not detected	Not detected
12 (SP)	28.99	32.18	7.11E+05	Not detected	Not detected
17 (NT)	31.67	38.72	1.85E+04	Not detected	Not detected
19 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
21 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
22 (NT)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Case #6					
01 (NT)	26.28	29.70	3.15E+06	37.02	1.43E+05
03 (ETA)	21.50	24.33	6.31E+07	33.40	1.26E+06
04 (SP)	16.50	29.15	4.30E+06	38.27	3.64E+04
05 (SP)	23.94	29.02	4.61E+06	37.80	2.04E+05
09 (NT)	31.70	34.69	1.95E+05	Not detected	Not detected
13 (NT)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
14 (NT)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Case #7					
01 (NST)	13.81	17.35	1.98E+09	23.89	5.18E+07
06 (NST)	20.18	24.21	4.33E+07	31.57	7.13E+05
11 (NST)	22.56	26.40	1.28E+07	35.60	7.50E+04
13 (NST)	29.34	33.03	3.15E+05	Not detected	Not detected
14 (NST)	28.29	32.18	5.06E+05	Not detected	Not detected
15 (NT)	21.84	25.24	2.43E+07	33.72	2.15E+05
18 (NT)	36.28	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
21 (NST)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
23 (NT)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected

Case #8					
01 (SP)	17.13	18.29	2.45E+09	27.34	8.91E+06
02 (ETA)	14.74	17.33	4.19E+09	26.51	1.48E+07
03 (SP)	18.22	25.95	3.43E+07	36.27	4.05E+04
04 (SP)	18.53	21.29	4.61E+08	30.97	9.99E+05
05 (SP)	28.83	31.62	1.45E+06	Not detected	Not detected
06 (SP)	27.62	32.11	1.10E+06	Not detected	Not detected
07 (SP)	32.67	38.68	2.81E+04	Not detected	Not detected
08 (SP)	30.86	35.70	1.49E+05	Not detected	Not detected
10 (SP)	30.32	37.61	5.10E+04	Not detected	Not detected
12 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
14 (SP)	22.93	28.84	6.80E+06	38.45	1.09E+04
16 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Case #9					
01 (SP)	18.36	21.17	4.56E+08	33.77	2.18E+05
04 (ETA)	20.08	25.6	3.85E+07	36.14	5.21E+04
05 (SP)	21.12	26.29	2.61E+07	36.17	5.11E+04
06 (SP)	20.82	25.44	4.21E+07	35.26	8.88E+04
08 (ETA)	27.59	34.44	2.79E+05	35.07	9.95E+04
10 (ETA)	25.64	29.15	5.30E+06	37.42	2.41E+04
13 (NT)	29.74	35.1	1.91E+05	Not detected	Not detected
18 (SP)	32.54	34.77	2.30E+05	Not detected	Not detected
24 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
26 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Case #10					
01 (SP)	21.67	26.27	2.03E+07	32.35	6.06E+05
02 (SP)	30.74	33.76	3.10E+05	Not detected	Not detected
03 (SP)	27.68	31.85	9.05E+05	38.99	1.10E+04
04 (SP)	27.01	31.16	1.33E+06	38.64	1.36E+04
06 (SP)	22.07	28.10	7.30E+06	34.27	1.90E+05
08 (NST)	15.93	19.56	8.56E+08	27.89	8.99E+06
10 (SP)	24.84	29.57	3.23E+06	34.96	1.25E+05
12 (SP)	30.65	35.36	1.28E+05	Not detected	Not detected
15 (NT)	34.93	37.74	3.38E+04	Not detected	Not detected
19 (SP)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
21 (NT)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณไวรัส (RNA viral load) ระหว่างกลุ่มที่ตรวจพบ subgenomic RNA leader (Detected) กับกลุ่มที่ตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader (Not detected)

เมื่อนำผลการทดลอง plot กราฟ แกน X แสดงกลุ่มของ subgenomic RNA leader ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มสีแดง คือ ตรวจพบ subgenomic RNA leader (Detected) และกลุ่มสีเขียว คือ ตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader (Not detected) ส่วนแกน Y แสดงปริมาณไวรัส ซึ่งจะพบว่าปริมาณไวรัสที่มีมากกว่า 10^5 copies/ml หรือ 100,000 copies/ml จะตรวจพบ subgenomic RNA leader แต่ในทางกลับกันถ้ามีปริมาณไวรัสที่มีน้อยกว่า 10^5 copies/ml ก็จะตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader อย่างไรก็ตามในบางตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสมากกว่า 10^5 copies/ml ก็ตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader ได้เช่นกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธี real time qRT-PCR ในการตรวจติดตาม SARS-CoV-2 subgenomic RNA leader ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกสถานะไวรัสที่มีความสามารถในการแบ่งตัว/เพิ่มจำนวน (active viral replication) หรือไวรัสในระยะติดเชื้อ จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 จำนวน 10 ราย ซึ่งให้เห็นว่า subgenomic RNA leader นั้นสามารถตรวจพบได้นานถึง 15 วันแรกที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ตรวจพบ subgenomic RNA leader ที่มีปริมาณไวรัส (viral load) มากกว่า 100,000 copies/ml ($\geq 10^5$ copies/ml) แต่มีบางตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัส $\geq 10^6$ copies/ml กลับตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณไวรัส หรือ genomic RNA ที่มีอยู่มากก็ตาม ไม่สามารถนำมาใช้ในการทำนายว่ามี subgenomic RNA leader หรือมี live virus อยู่หรือไม่ ซึ่งการศึกษานี้ได้ผลการทดลองคล้ายกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งนักวิจัยพบว่าบางตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัส $\geq 6\log_{10}$ virus N gene ก็ตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader (LOD $\geq 6\log_{10}$ virus N gene copies/ml) แม้ genomic RNA ยังคงตรวจพบได้นานถึง 50 วัน [31]

ซึ่งในการศึกษานี้ได้อนุมานว่าการตรวจพบ subgenomic RNA leader แสดงถึงสถานะการติดเชื้อ หรือระดับของการติดเชื้อ หรือไม่ ยังไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากการตรวจพบ subgenomic RNA leader ยังไม่ได้รับการพิสูจน์จากการวิธีเพาะเชื้อ (virus culture) ใดๆก็ตามมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งแสดงหลักฐานข้างต้น ที่มีศึกษาการเพาะเลี้ยงไวรัส SARS-CoV-2 พบว่าผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่าง subgenomic RNA leader กับการติดเชื้อ โดยมีการตรวจพบ subgenomic RNA leader จำนวนมากในเซลล์ที่ติดเชื้อ จากข้อมูลนี้ทำให้นักวิจัยเชื่อว่าการตรวจพบ subgenomic RNA leader เป็นหลักฐานแสดงถึงสถานะไวรัสที่มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ติดเชื้อ [10, 31]

อย่างไรก็ตามการตรวจติดตาม SARS-CoV-2 subgenomic RNA leader เบื้องต้นนี้สามารถนำมาใช้ในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19 ได้ ถึงแม้ว่ายังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนในข้อมูลที่ตรวจพบเพียง genomic RNA ผู้ป่วยยังติดเชื้อไวรัสอยู่หรือไม่ หรือสามารถแพร่เชื้อได้หรือไม่ จากข้อมูลวิเคราะห์ที่ได้จากการทบทวนวรรณกรรมก่อนหน้านี้ รวมถึงงานวิจัยในครั้งนี้เป็นการพยายามหาปัจจัยยึดเหนี่ยวเพื่อกำหนดว่าไวรัสที่ยังปล่อย (viral shedding) ออกมานั้นไม่สามารถเพิ่มจำนวน หรือแพร่เชื้อได้ โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณของ subgenomic RNA leader (ของยีนต่างๆ เช่น N gene หรือ E gene) รวมถึงระยะเวลาการตรวจพบจนกระทั่งตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader และปริมาณของ genomic RNA กับการเพาะเชื้อไวรัสขึ้นหรือไม่

ในปัจจุบันมีข้อมูลตรงกันในการยึด subgenomic RNA leader เป็นหลักฐานบ่งบอกถึงไวรัสที่นั้นอยู่ในระยะ active viral replication ที่มีความสามารถเพิ่มจำนวน/แพร่เชื้อได้ และพยายามเชื่อมโยงกับปริมาณของ genomic RNA น้อยกว่า $6\log_{10}$ (N gene) [31] หรือน้อยกว่า $5\log_{10}$ (E gene) ของงานวิจัยในครั้งนี้ไวรัสน่าจะมีความเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อต่ำ รวมถึงการมีภูมิคุ้มกันยับยั้งไวรัส (neutralizing antibody) เกิน 1:10 ไวรัสน่าจะมีความเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อต่ำเช่นกัน และสัมพันธ์กับระยะเวลา 10 วันโดยประมาณ [32]

จากหลักฐานข้างต้นล่าสุดพบว่าการยึด subgenomic RNA leader เป็นตัวตัดสินที่สำคัญ ถึงแม้ว่าปริมาณของ genomic RNA จะยังมีมหาศาลก็ตามแต่ไม่สามารถเพาะเชื้อขึ้น และยังพบว่า genomic RNA ยังคงอยู่ได้นานถึง 50 วัน [31]

ดังนั้นหลักการอนุญาตให้ผู้ป่วย COVID-19 กลับบ้านในขณะที่ยังตรวจพบ genomic RNA อยู่บ้าง โดยยึดหลักตามแนวทางการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อ COVID-19 [32] ซึ่งมีมูลเหตุมาจากการศึกษาโดยมีการพิจารณาจากผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรง และผู้ป่วยที่ไม่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ถ้ายังตรวจพบ genomic RNA ไวรัสอยู่บ้าง ซึ่งมีปริมาณ genomic RNA ไวรัส (E gene) ที่ตรวจพบน้อยกว่า 100,000 copies/ml [10] และที่สำคัญจะต้องตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader หากเป็นเช่นนั้นผู้ติดเชื้อจำเป็นต้องกักตัว หรือแยกตัวออกจากผู้อื่น เป็นเวลาอย่างน้อย 14 วัน ปล่อยให้ปริมาณ genomic RNA ค่อย ๆ ลดลงเองตามลำดับ หรือทำการตรวจซ้ำ ๆ อีกจนกระทั่งตรวจไม่พบ genomic RNA (ถ้าสามารถทำได้)

ข้อดีของการประเมิน subgenomic RNA leader นำผลการวิเคราะห์ประกอบกับข้อมูลต่างๆ ทางคลินิกของผู้ป่วยเฉพาะรายบุคคล ช่วยลดระยะเวลาในการรักษาตัวในโรงพยาบาลให้สั้นลง ช่วยลดปัญหาเตียงและอุปกรณ์การแพทย์ไม่เพียงพอต่อการรองรับผู้ป่วยจำนวนมาก รวมถึงช่วยลดค่าใช้จ่ายในด้านการรักษาทางการแพทย์

ข้อจำกัดในงานวิจัยครั้งนี้

- ข้อที่ 1 การตรวจพบ subgenomic RNA leader ยังขาดการพิสูจน์ด้วยวิธีการเพาะเชื้อ
- ข้อที่ 2 ปริมาณตัวอย่างมีจำนวนจำกัด ไม่สามารถนำมาทดสอบซ้ำหรือทดสอบเพิ่มเติมได้
- ข้อที่ 3 ไม่มีข้อมูลทางคลินิกเพื่อใช้ประกอบกับการวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย

อย่างไรก็ตามนอกจากเชื้อไวรัสแล้วผลการรักษาที่ยังขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น การมีโรคประจำตัวและสุขภาพของผู้ป่วย ระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติ (aberrant immune responses) มีผลต่อการกำจัดเชื้อไวรัส การอักเสบ (cytokine storm) มีผลต่อการดำเนินโรค และวิธีการรักษาผู้ป่วยขณะติดเชื้อ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่า subgenomic RNA leader สามารถปรากฏตัวเกิดขึ้นได้อีกครั้ง จากผลการวิเคราะห์ของผู้ป่วย COVID-19 มีจำนวน 2 ใน 10 ราย อาจเป็นไปได้ว่าไวรัส COVID-19 สามารถหลบซ่อนในเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายได้ แต่จะหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันได้ชั่วคราว ในปัจจุบัน ระยะเวลาการกักตัวหรือแยกตัวสำหรับผู้ติดเชื้อ หรือการตรวจพบเชื้อไวรัส COVID-19 ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งการแยกตัวออกจากผู้อื่นจนกว่าการตรวจซ้ำด้วยวิธี RT-PCR ไม่พบเชื้อไวรัสติดกัน 2 ครั้ง หรือ 2 วัน จะต้องใช้เวลานานหลายสัปดาห์ งานวิจัยนี้ได้มีการค้นพบว่า subgenomic RNA leader สามารถปรากฏตัวเกิดขึ้นได้อีกครั้ง หลังจากที่ตรวจไม่พบ subgenomic RNA leader แล้วเป็นเวลา 2 วัน จนถึง 8 วันต่อเนื่อง ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้จะช่วยสนับสนุนให้ผู้ติดเชื้อกักตัวหรือแยกตัวออกจากผู้อื่นเป็นเวลาอย่างน้อย 14 วัน ถึงจะปลอดภัยไม่แพร่เชื้อ



บรรณานุกรม

1. Organization, W.H., *Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected: interim guidance*. 2020.
2. Wajnberg, A., et al., *Humoral immune response and prolonged PCR positivity in a cohort of 1343 SARS-CoV 2 patients in the New York City region*. 2020.
3. Wu, Y., et al., *Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples*. 2020. **5**(5): p. 434-435.
4. Zou, L., et al., *SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients*. 2020. **382**(12): p. 1177-1179.
5. Li, T.Z., et al., *Duration of SARS-CoV-2 RNA shedding and factors associated with prolonged viral shedding in patients with COVID-19*. 2021. **93**(1): p. 506-512.
6. Liu, Y., et al., *Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19*. 2020. **20**(6): p. 656-657.
7. Widders, A., et al., *SARS-CoV-2: The viral shedding vs infectivity dilemma*. 2020. **25**(3): p. 210-215.
8. Zhou, F., et al., *Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study*. 2020. **395**(10229): p. 1054-1062.
9. van Kampen, J.J., et al., *Shedding of infectious virus in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19): duration and key determinants*. 2020.
10. Wölfel, R., et al., *Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019*. 2020. **581**(7809): p. 465-469.
11. Milewska, A., et al., *Replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in human respiratory epithelium*. 2020. **94**(15).
12. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*. 2020. **395**(10224): p. 565-574.

13. Zhou, P., et al., *Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin*. 2020.
14. Kim, D., et al., *The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome*. 2020. **181**(4): p. 914-921. e10.
15. Mousavizadeh, L., S.J.J.o.M. Ghasemi, *Immunology, and Infection, Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis*. 2020.
16. Sola, I., et al., *Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses*. 2015. **2**: p. 265-288.
17. Weiss, S.R.J.J.o.E.M., *Forty years with coronaviruses*. 2020. **217**(5).
18. Shereen, M.A., et al., *COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses*. 2020. **24**: p. 91-98.
19. Walls, A.C., et al., *Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein*. 2020. **181**(2): p. 281-292. e6.
20. Kujawski, S.A., et al., *Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States*. 2020.
21. Chen, L., et al., *Ocular manifestations and clinical characteristics of 535 cases of COVID-19 in Wuhan, China: a cross-sectional study*. 2020. **98**(8): p. e951-e959.
22. Huang, Y., et al., *Clinical characteristics of laboratory confirmed positive cases of SARS-CoV-2 infection in Wuhan, China: A retrospective single center analysis*. 2020.
23. Jin, Y., et al., *Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19*. 2020. **12**(4): p. 372.
24. Mercatelli, D. and F.M.J.F.i.m. Giorgi, *Geographic and genomic distribution of SARS-CoV-2 mutations*. 2020. **11**: p. 1800.
25. Zhang, W., et al., *Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes*. 2020. **9**(1): p. 386-389.
26. Xiang, J., et al., *Evaluation of enzyme-linked immunoassay and colloidal gold-immunochromatographic assay kit for detection of novel coronavirus (SARS-Cov-2) causing an outbreak of pneumonia (COVID-19)*. 2020.

27. Organization, W.H., *Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020*. 2020, World Health Organization.
28. van Kasteren, P.B., et al., *Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19*. 2020. **128**: p. 104412.
29. Sethuraman, N., S.S. Jeremiah, and A.J.J. Ryo, *Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2*. 2020. **323**(22): p. 2249-2251.
30. Corman, V.M., et al., *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR*. 2020. **25**(3): p. 2000045.
31. Perera, R.A., et al., *SARS-CoV-2 virus culture from the upper respiratory tract: Correlation with viral load, subgenomic viral RNA and duration of illness*. 2020.
32. Organization, W.H., *Criteria for releasing COVID-19 patients from isolation: scientific brief, 17 June 2020*. 2020, World Health Organization.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

1. การสกัดสารพันธุกรรม ด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ magLEAD 12gC

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

ดูดตัวอย่างใส่ sample tube 0.4 ml

ขั้นตอนการสกัด nucleic acid

1. เปิดเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ
2. เลือก function การใช้งาน
3. เตรียม cartridge น้ำยาสกัดสารพันธุกรรมและ tip ก่อนการใช้งาน ควรเช็คว่ามีส่วนประกอบของน้ำยาติดบริเวณด้านบนใน cartridge หากมีน้ำยาติดบริเวณด้านบนใน cartridge สะบัดให้ส่วนประกอบของน้ำยาตกลงมาและต้องไม่มีฟองอากาศ

จำนวน consumable ที่ใช้ต่อการสกัด 1 ตัวอย่าง มีดังนี้

Nucleic acid extraction cartridge MagDEA® Dx SV	1 ชิ้น
Tip set	1 ชิ้น
Collection tube	1 ชิ้น
Sample tube	1 ชิ้น

4. เลือก protocol สำหรับการใช้งาน
5. ตรวจสอบการจัดวางองค์ประกอบชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม MagDEA® Dx SV, Sample tube, Collection tube สำหรับใส่ elution, Tip rack จัดวางอย่างถูกต้องตามคู่มือคำแนะนำการใช้งาน
6. ปิดฝาประตูเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ
7. กดปุ่ม start เพื่อเริ่มขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ใช้เวลาในการสกัด 30 นาที
8. หลังจากสกัดสารพันธุกรรมเรียบร้อยแล้ว ทำการเก็บ elution 50 ul ที่อยู่ใน Collection tube ออกจากเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ และติดสติ๊กเกอร์หลอดให้เรียบร้อย
9. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm นาน 2 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C รอทำ real time RT-PCR

Reference: magLEAD 12gC (Precision System Science Co., Ltd.)

2. การสกัดสารพันธุกรรมด้วยหลักการ Boom (Nucleic acid extraction)

ชนิดตัวอย่าง : Nasopharyngeal Swab, Throat swab, Sputum, Nasal swab

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่ต้องการสกัด 0.4 ml ใส่ลงไปใน lysis buffer 2 ml นำไป vortex และ Incubate ที่

อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการสกัด

ขั้นตอนการสกัด nucleic acid

1. เติม magnetic silica suspension 50 μ l (โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลง เพื่อให้ silica แยกละเอียด หรือไม่ให้จับตัวกันเป็นก้อน ก่อนทุกครั้ง) จากนั้น Incubate ที่ RT นาน 10 นาที

หมายเหตุ ห้าม mix สารละลายภายในหลอดเป็นอันขาด

2. นำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 2 นาที จากนั้นดูดหรือเท supernatant ออกจาก tube แล้วใช้กระดาษทิชชูซับให้แห้ง

3. เติม wash buffer 1 500 μ l ใช้ pipette ดูดขึ้นลง แล้วดูดใส่หลอด 1.5 ml

4. วางหลอดบนเครื่อง miniMAG (Magnet on) ล้าง 30 วินาที ดูดหรือ section น้ำส่วนใสออก

5. ปลดแผ่นแม่เหล็กลง (Magnet off) เติม wash buffer 1 400 μ l ใช้ pipette ดูดขึ้นลง จากนั้น miniMAG (Magnet on) ล้าง 30 วินาที ดูดหรือ section น้ำส่วนใสออก (ครั้งที่ 1)

6. ปลดแผ่นแม่เหล็กลง (Magnet off) เติม wash buffer 1 400 μ l ใช้ pipette ดูดขึ้นลง จากนั้น miniMAG (Magnet on) ล้าง 30 วินาที ดูดหรือ section น้ำส่วนใสออก (ครั้งที่ 2)

7. ปลดแผ่นแม่เหล็กลง (Magnet off) เติม wash buffer 2 500 μ l ใช้ pipette ดูดขึ้นลง จากนั้น miniMAG (Magnet on) ล้าง 30 วินาที ดูดหรือ section น้ำส่วนใสออก (ครั้งที่ 1)

8. ปลดแผ่นแม่เหล็กลง (Magnet off) เติม wash buffer 2 500 μ l ใช้ pipette ดูดขึ้นลง จากนั้น miniMAG (Magnet on) ล้าง 30 วินาที ดูดหรือ section น้ำส่วนใสออก (ครั้งที่ 2)

9. ปลดแผ่นแม่เหล็กลง (Magnet off) เติม wash buffer 3 500 μ l ใช้ pipette ดูดขึ้นลง จากนั้น miniMAG (Magnet on) ล้าง 15 วินาที ดูดหรือ section น้ำส่วนใสออก

10. เติม Elution buffer 50 μ l นำไป Incubate 5 นาที วางหลอดบนเครื่อง Thermoshaker (speed 1400 rpm, อุณหภูมิ 60°C)

11. นำหลอดวางบนเครื่อง miniMAG (Magnet on) ดูดสารละลาย eluent 50 μ l ใส่หลอด screw cap ก้นแหลม และติดสติ๊กเกอร์หลอดให้เรียบร้อย

12. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm นาน 2 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C รอทำ real time RT-PCR

Reference: NucliSens Magnetic Extraction

ภาคผนวก ข

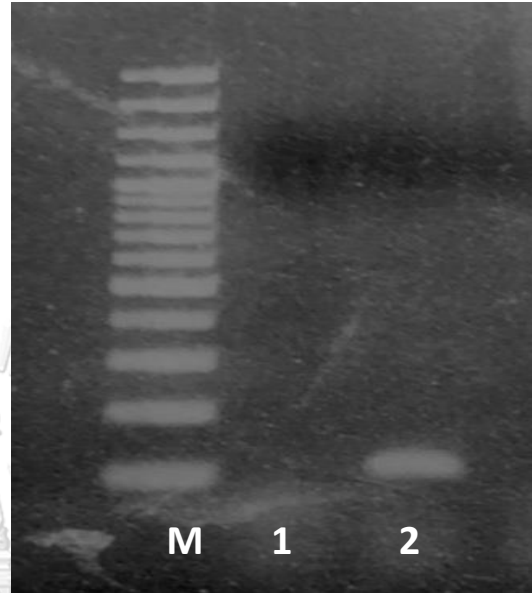
ภาพประกอบ 20 การรันเจล PCR product ที่ได้จากการตรวจหา subgenomic RNA leader ด้วยวิธี real time RT-PCR

M: 100 bp. DNA marker

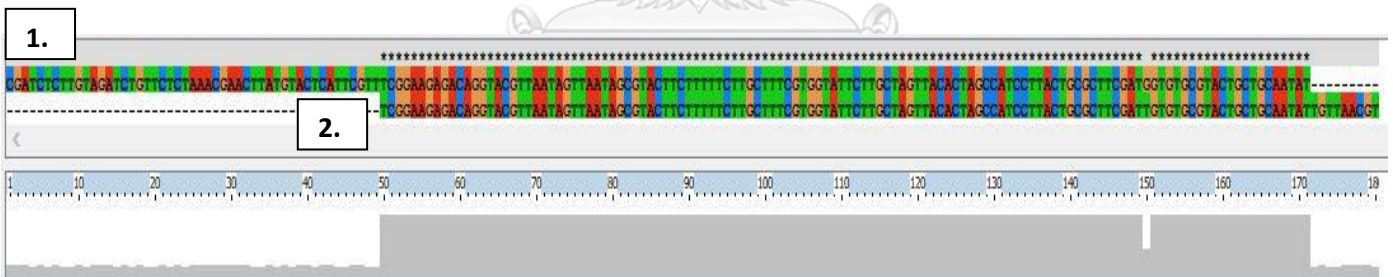
1: Negative control

2: SARS-CoV-2 culture (RNA)

ขนาด 171 bp.



ภาพประกอบ 21 การวิเคราะห์ subgenomic RNA leader และ genomic RNA sequence ด้วยการทำให้ alignment



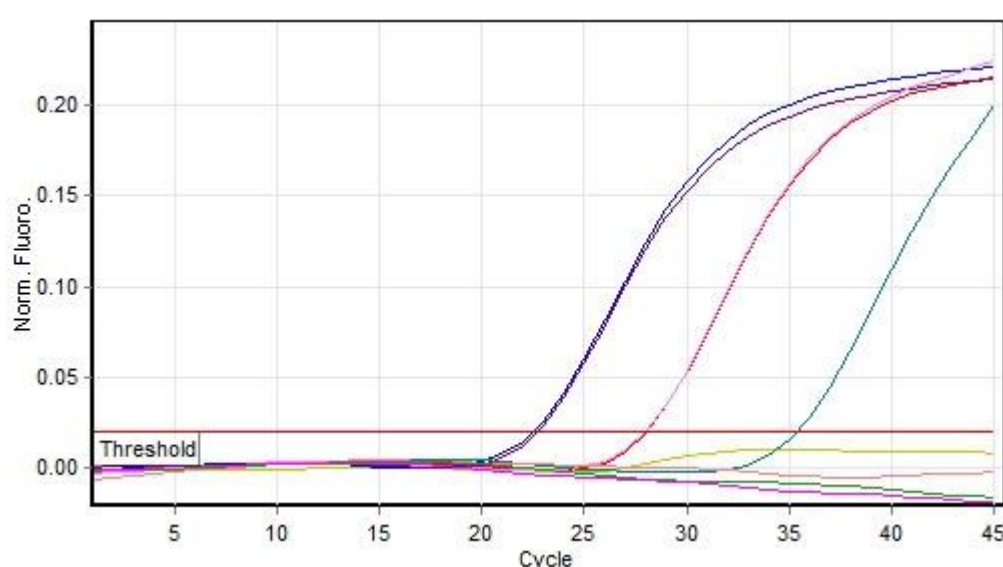
1: subgenomic RNA leader sequence 171 bp.

2: genomic RNA sequence 113 bp.

ภาคผนวก ค

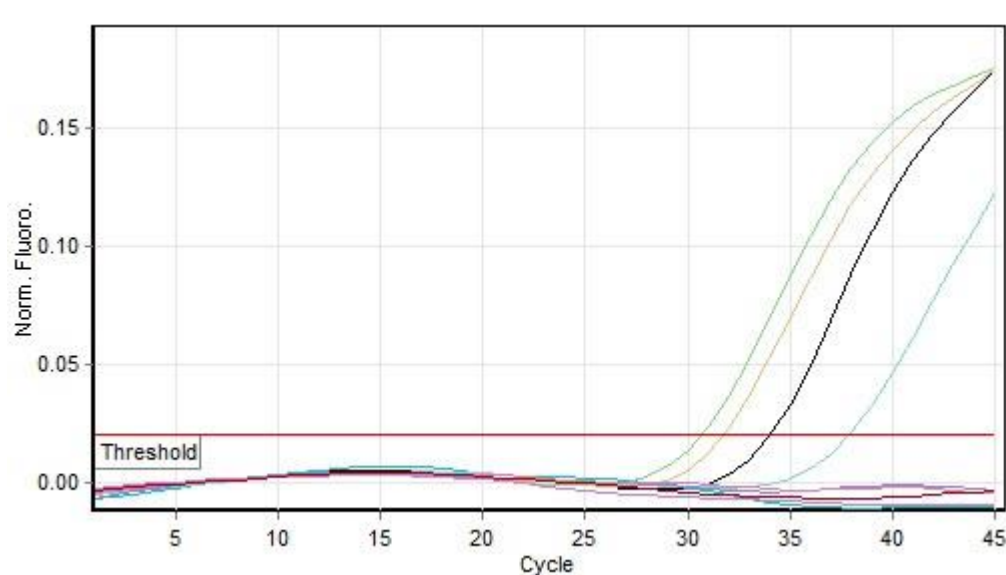
ผลการตรวจหา genomic RNA และ subgenomic RNA leader ด้วยวิธี real time qRT-PCR ของผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัส COVID-19

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 1



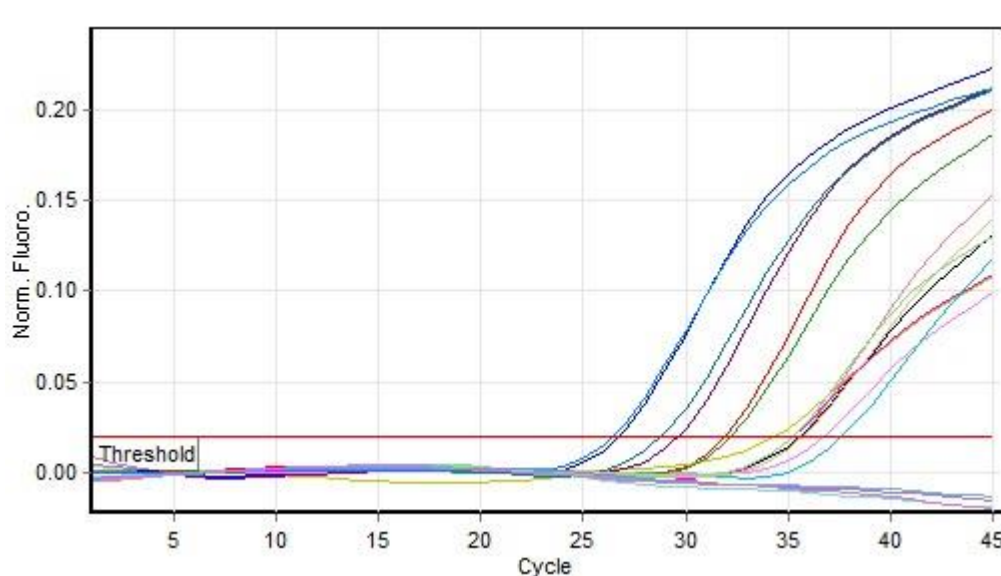
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
1	Red	PC genomic 1*10 ⁵	Standard	28.04	1.00E+05
2	Yellow	water	Negative control		
3	Blue	SI2011912-g	Unknown	22.53	2.17E+06
4	Purple	SI2012109-g	Unknown	22.71	1.97E+06
5	Pink	SI2012284-g	Unknown	27.99	1.03E+05
7	Teal	SI2012577-g	Unknown	35.43	1.63E+03
8	Light Red	SI2012645-g	Unknown		
9	Green	SI2012781-g	Unknown		
10	Magenta	SI2012844-g	Unknown		

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 1



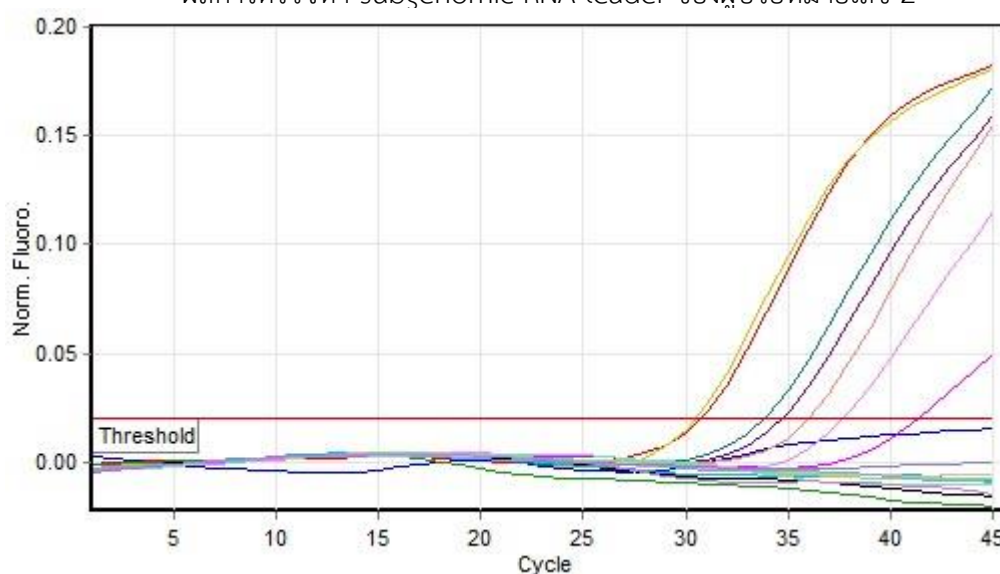
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
11	■	PC subgenomic 1*10 ³	Standard	34.10	1.00E+03
12	■	water	Negative control		
13	■	SI2011912-sg	Unknown	31.76	4.10E+03
14	■	SI2012109-sg	Unknown	30.71	7.75E+03
15	■	SI2012284-sg	Unknown	37.91	1.00E+02
17	■	SI2012577-sg	Unknown		
18	■	SI2012645-sg	Unknown		
19	■	SI2012781-sg	Unknown		
20	■	SI2012844-sg	Unknown		

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 2



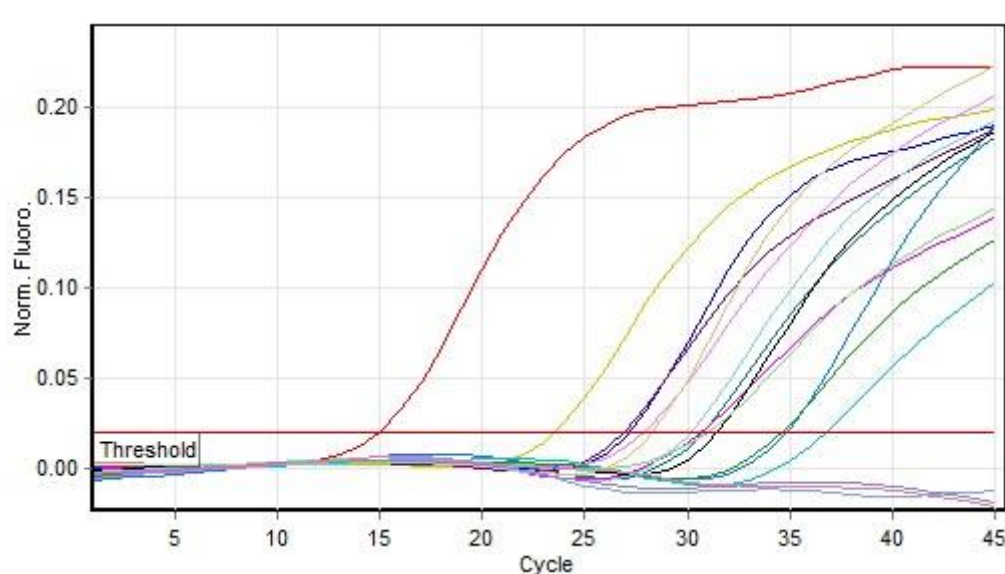
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
1	Red	PC 1*10 ⁴ -g	Standard	31.92	1.00E+04
2	Blue	SI208678-g	Unknown	26.77	1.76E+05
3	Purple	SI2010355-g	Unknown	29.61	3.63E+04
4	Light Blue	SI2010525-g	Unknown	26.46	2.10E+05
5	Teal	SI2010954-g	Unknown	28.82	5.64E+04
6	Light Red	SI2011146-g	Unknown	35.61	1.28E+03
7	Green	SI2011256-g	Unknown	32.24	8.35E+03
8	Magenta	SI2011366-g	Unknown	35.27	1.55E+03
9	Black	SI2011595-g	Unknown	35.56	1.31E+03
10	Cyan	SI2012973-g	Unknown	37.64	4.12E+02
11	Olive	SI2012471-g	Unknown	35.75	1.18E+03
12	Light Green	SI2011762-g	Unknown	35.26	1.55E+03
13	Light Teal	SI2013206-g	Unknown		
14	Light Blue	SI2013290-g	Unknown		
15	Light Purple	SI2013365-g	Unknown		
16	Light Purple	SI2013389-g	Unknown		

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 2



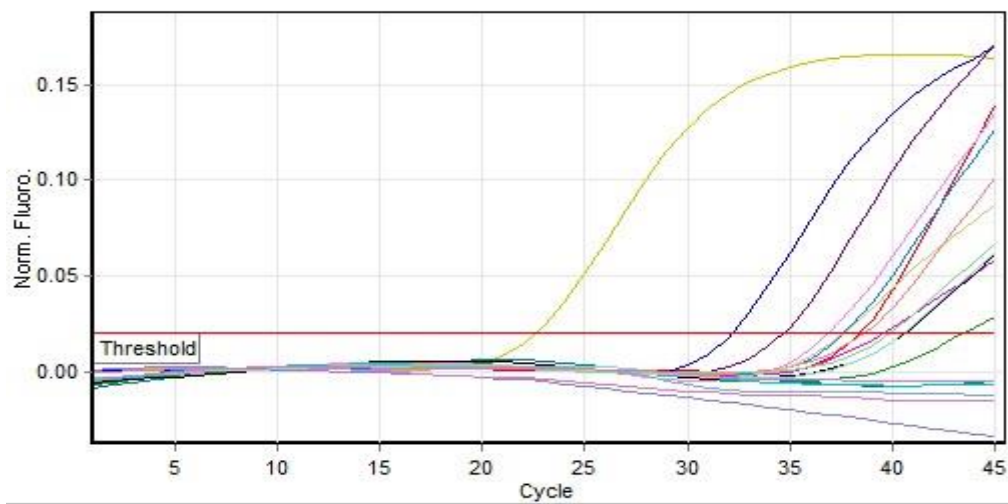
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/u)
1	Red	PC 1*10 ⁴ -sg	Standard	30.75	1.00E+04
2	Yellow	SI208678-sg	Unknown	30.50	1.16E+04
3	Blue	water	Negative control		
4	Purple	SI2010525-sg	Unknown	34.72	9.09E+02
5	Pink	SI2010954-sg	Unknown	37.71	1.49E+02
6	Teal	SI2010355-sg	Unknown	33.88	1.51E+03
7	Light Red	SI2011146-sg	Unknown	36.02	4.14E+02
8	Green	SI2011256-sg	Unknown		
9	Magenta	SI2011366-sg	Unknown	41.39 = Neg	1.62E+01
10	Black	SI2011595-sg	Unknown		
11	Cyan	SI2011762-sg	Unknown		
12	Olive	SI2012471-sg	Unknown		
13	Light Green	SI2012973-sg	Unknown		
14	Light Blue	SI2013206-sg	Unknown		
15	Blue	SI2013290-sg	Unknown		
16	Dark Purple	SI2013365-sg	Unknown		
17	Light Purple	SI2013389-sg	Unknown		

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 3



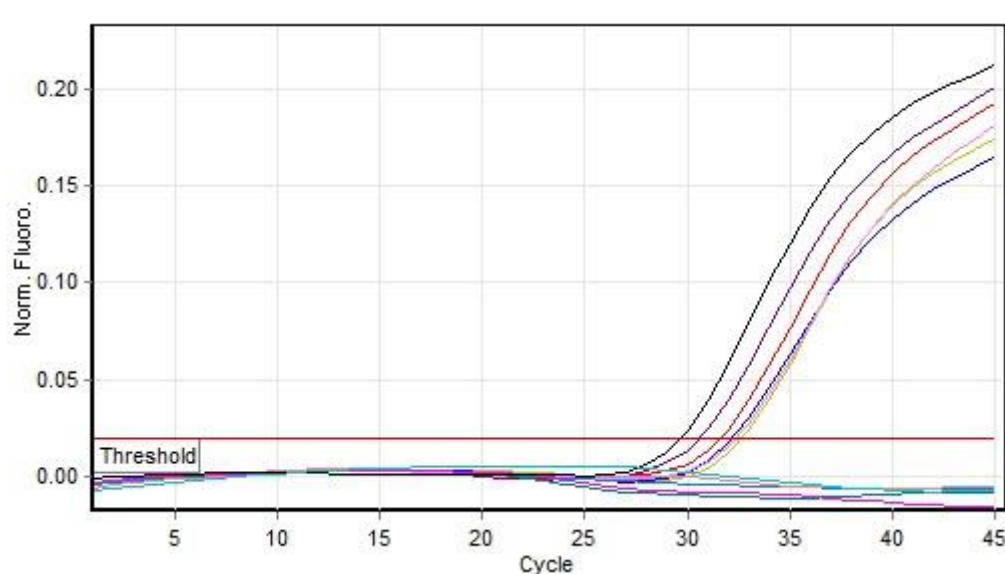
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
1	Red	SI1204839-g	Unknown	14.96	5.62E+07
2	Yellow	SI1207489-g	Unknown	23.53	4.70E+05
3	Blue	SI1208822-g	Unknown	27.15	6.25E+04
4	Purple	SI12010275-g	Unknown	26.86	7.37E+04
5	Pink	SI12010417-g	Unknown	27.89	4.13E+04
6	Light Blue	SI12010553-g	Unknown	34.84	8.57E+02
7	Teal	SI12010660-g	Unknown	30.72	8.53E+03
8	Green	SI12010966-g	Unknown	34.56	1.00E+03
9	Magenta	SI12011113-g	Unknown	30.66	8.85E+03
10	Black	SI12011368-g	Unknown	31.41	5.83E+03
11	Cyan	SI12011523-g	Unknown	36.72	3.01E+02
12	Olive	SI12011600-g	Unknown	28.27	3.34E+04
13	Light Green	SI12011717-g	Unknown	30.98	7.39E+03
14	Light Cyan	SI12011911-g	Unknown	30.12	1.20E+04
15	Blue-Gray	SI12012112-g	Unknown		
16	Purple	SI12012287-g	Unknown		
17	Pink	SI12012576-g	Unknown		

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 3



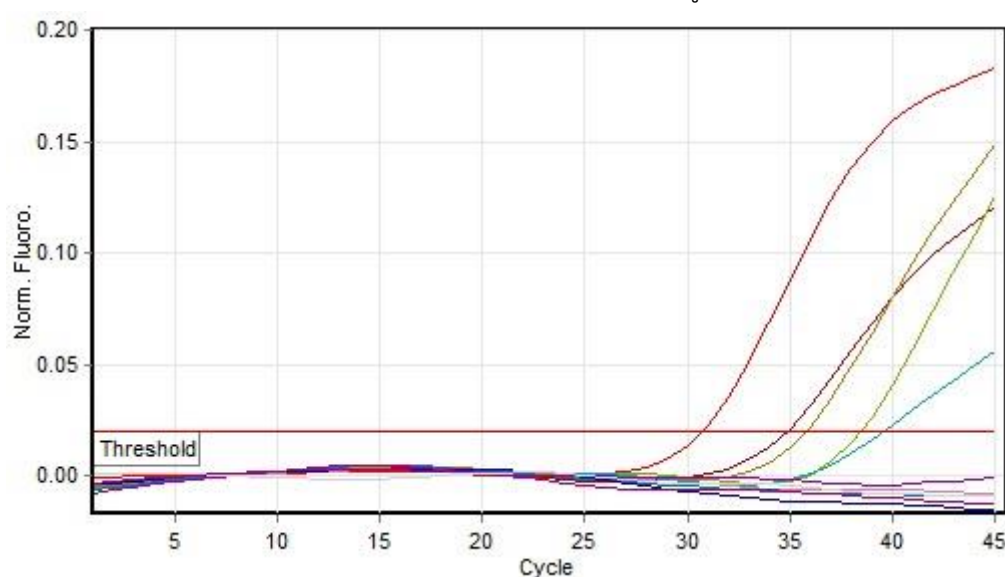
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
1	Red	water	Negative control		
2	Yellow	SI204839-sg	Unknown	22.64	3.22E+06
3	Blue	SI207489-sg	Unknown	32.20	1.00E+04
4	Purple	SI208822-sg	Unknown	34.72	2.18E+03
5	Pink	SI2010275-sg	Unknown	36.92	5.77E+02
6	Light Blue	SI2010417-sg	Unknown	37.66	3.69E+02
7	Teal	SI2010553-sg	Unknown	37.63	3.76E+02
8	Light Red	SI2010660-sg	Unknown	38.62	2.07E+02
9	Green	SI2010966-sg	Unknown	43.52 =Neg	1.07E+01
10	Magenta	SI2011113-sg	Unknown	39.57 =Neg	1.17E+02
11	Black	SI2011368-sg	Unknown	40.62 =Neg	6.17E+01
12	Cyan	SI2011523-sg	Unknown		
13	Gold	SI2011600-sg	Unknown		
14	Light Green	SI2011717-sg	Unknown	39.84 =Neg	9.88E+01
15	Light Cyan	SI2011911-sg	Unknown	40.54 =Neg	6.47E+01
16	Light Blue	SI2012112-sg	Unknown		
17	Dark Purple	SI2012287-sg	Unknown		
18	Dark Purple	SI2012576-sg	Unknown		

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 4



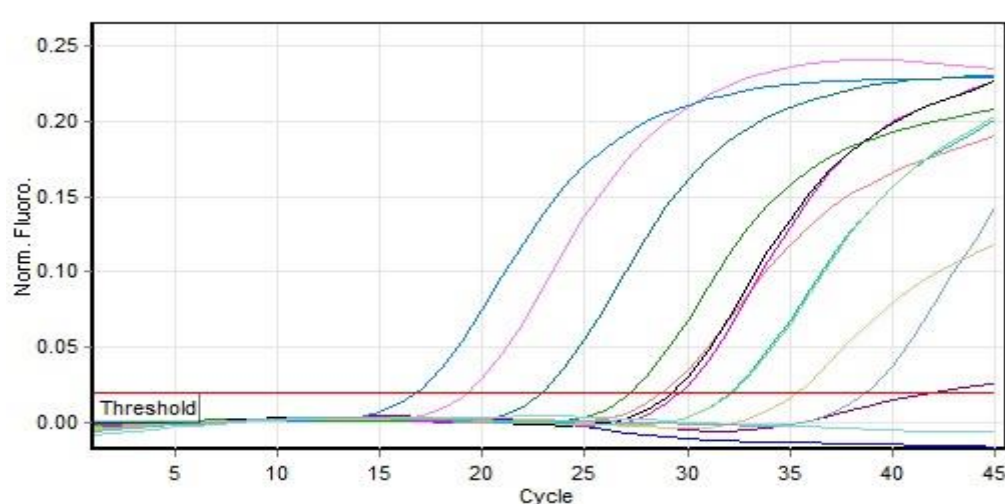
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
1	Red	SI205459-g	Unknown	31.65	3.36E+03
2	Yellow	SI207594-g	Unknown	32.70	1.87E+03
3	Blue	SI208677-g	Unknown	32.20	2.47E+03
4	Purple	SI2010006-g	Unknown	30.61	5.98E+03
5	Pink	SI2010356-g	Unknown	32.43	2.17E+03
6	Light Blue	SI2010524-g	Unknown		
7	Teal	SI2010784-g	Unknown		
8	Light Red	SI2010953-g	Unknown		
9	Magenta	SI2011112-g	Unknown		
10	Black	genomic PC 1*10 ⁴	Standard	29.69	1.00E+04
11	Cyan	water	Negative control		

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 4



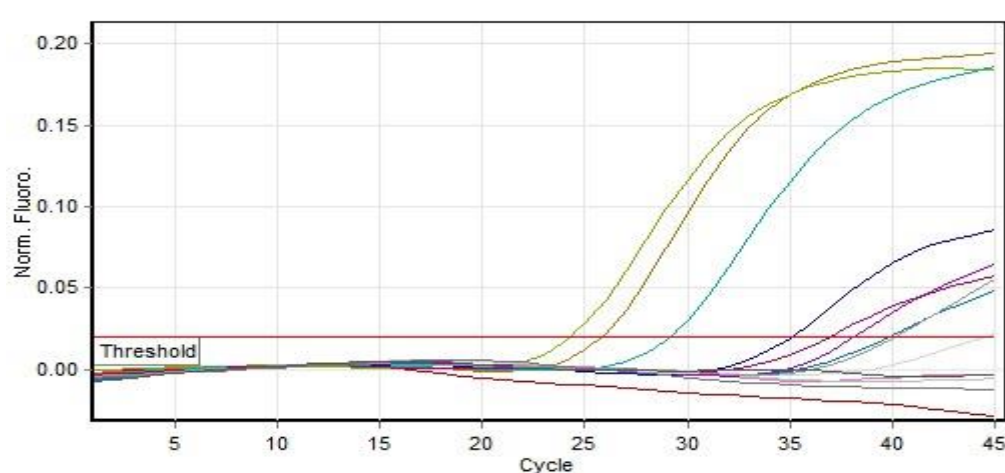
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
18	Red	PC 1*10 ⁴ -sg	Standard	30.75	1.00E+04
19	Pink	water	Negative control		
20	Dark Red	SI205459-sg	Unknown	34.86	8.37E+02
21	Brown	SI208677-sg	Unknown	35.82	4.67E+02
22	Green	SI207594-sg	Unknown	38.47	9.42E+01
23	Teal	SI2010006-sg	Unknown	39.57	4.85E+01
24	Blue	SI2010356-sg	Unknown		
25	Dark Blue	SI2010524-sg	Unknown		
26	Purple	SI2010784-sg	Unknown		
27	Magenta	SI2010953-sg	Unknown		
28	Grey	SI2011112-sg	Unknown		

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 5



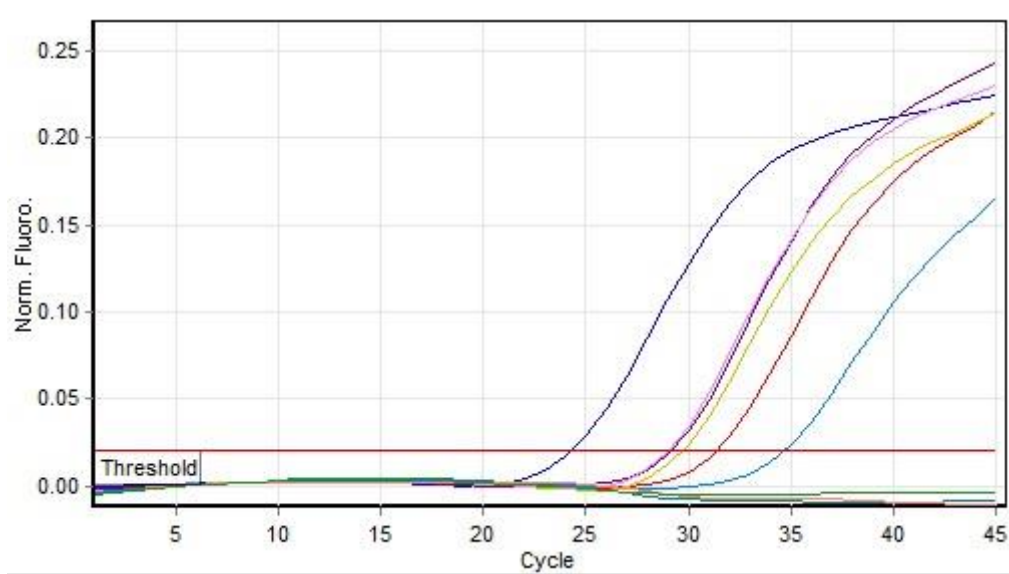
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
1	Blue	SI2013107-g	Unknown		
2	Purple	SI2013048-g	Unknown	41.98 =Neg	2.41E+01
3	Pink	SI2010069-g	Unknown	19.29	7.54E+06
4	Blue	SI2010403-g	Unknown	16.80	3.02E+07
5	Teal	SI2010576-g	Unknown	22.91	1.00E+06
6	Red	SI2010893-g	Unknown	28.83	3.69E+04
7	Green	SI2010982-g	Unknown	27.21	9.07E+04
8	Magenta	SI2011182-g	Unknown	29.67	2.31E+04
9	Black	SI2011287-g	Unknown	29.25	2.91E+04
10	Cyan	SI2011520-g	Unknown	32.11	5.89E+03
11	Olive	SI2011599-g	Unknown	35.34	9.73E+02
12	Light Green	SI2011714-g	Unknown	32.18	5.69E+03
13	Light Cyan	SI2012789-g	Unknown		
14	Light Blue	SI2012611-g	Unknown	38.72	1.48E+02

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 5



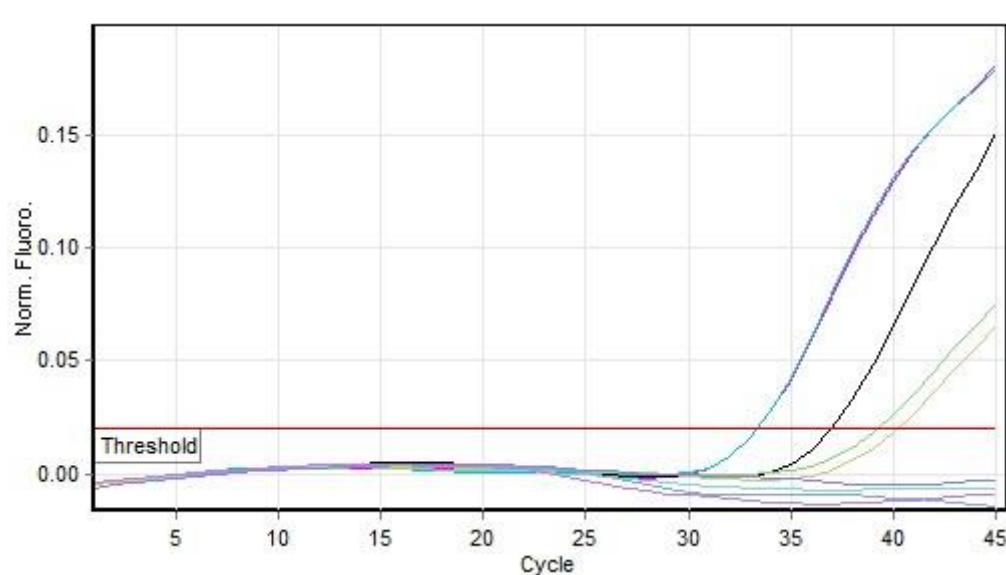
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
19	■	SI2013107-sg	Unknown		
20	■	SI2013048-sg	Unknown		
21	■	SI2010069-sg	Unknown	25.83	2.72E+05
22	■	SI2010403-sg	Unknown	24.33	6.73E+05
23	■	SI2010576-sg	Unknown	29.15	3.65E+04
24	■	SI2011287-sg	Unknown	39.74	6.09E+01
25	■	SI2010982-sg	Standard	35.11	1.00E+03
26	■	SI2011182-sg	Unknown	38.14	1.60E+02
27	■	SI2010893-sg	Unknown	36.93	3.33E+02
28	■	SI2011520-sg	Unknown	44.45 =Neg	3.55E+00
29	■	SI2011599-sg	Unknown		
30	■	SI2011714-sg	Unknown	40.13 =Neg	4.82E+01
31	■	SI2012789-sg	Unknown		
32	■	SI2012611-sg	Unknown		

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 6



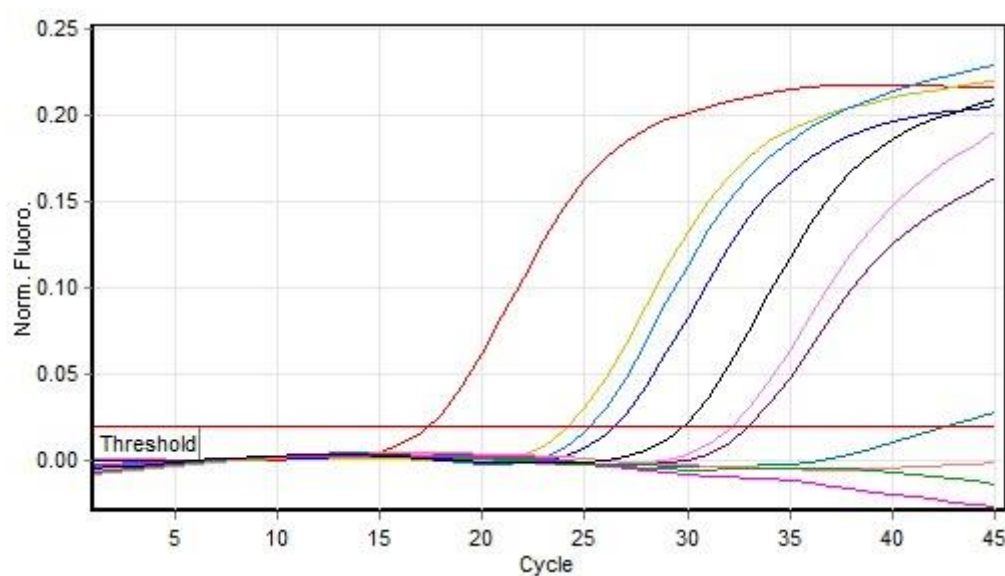
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
1	Red	genomic PC 1*10 ⁴	Standard	31.36	1.00E+04
2	Yellow	SI2010406-g	Unknown	29.70	2.52E+04
3	Blue	SI2010717-g	Unknown	24.33	5.05E+05
4	Purple	SI2010822-g	Unknown	29.15	3.44E+04
5	Pink	SI2011001-g	Unknown	29.02	3.69E+04
6	Light Blue	SI2011558-g	Unknown	34.69	1.56E+03
7	Teal	SI2012140-g	Unknown		
8	Light Red	SI2012329-g	Unknown		
9	Green	DW	Negative control		

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 6



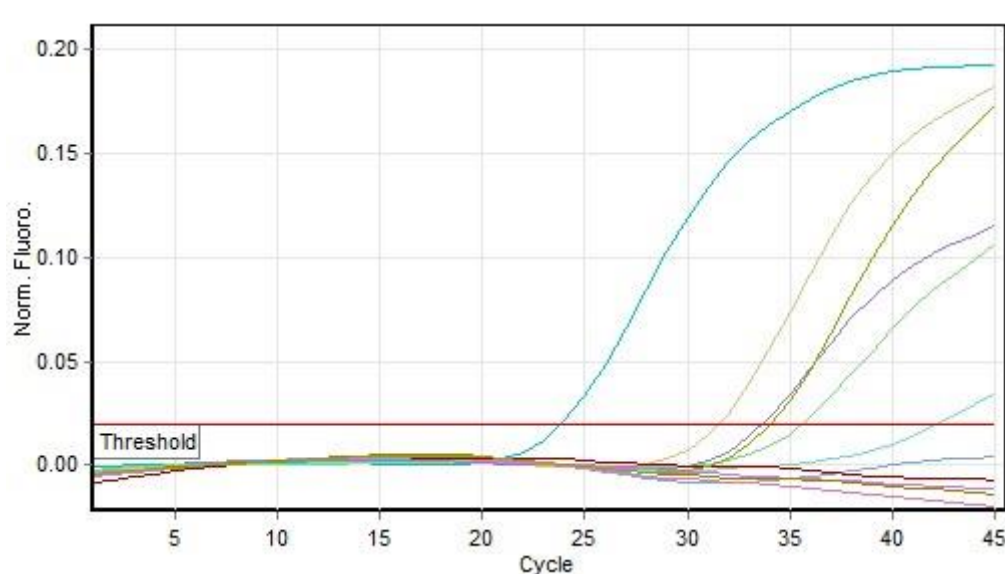
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/ul)
10	■	subgenomic PC 1*10 ⁴	Standard	33.42	1.00E+04
11	■	SI2010406-sg	Unknown	37.02	1.14E+03
12	■	SI2010717-sg	Unknown	33.40	1.01E+04
13	■	SI2010822-sg	Unknown	38.27	2.91E+02
14	■	SI2011001-sg	Unknown	37.80	1.63E+03
15	■	SI2011558-sg	Unknown		
16	■	SI2012140-sg	Unknown		
17	■	SI2012329-sg	Unknown		
18	■	DW	Negative control		

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 7



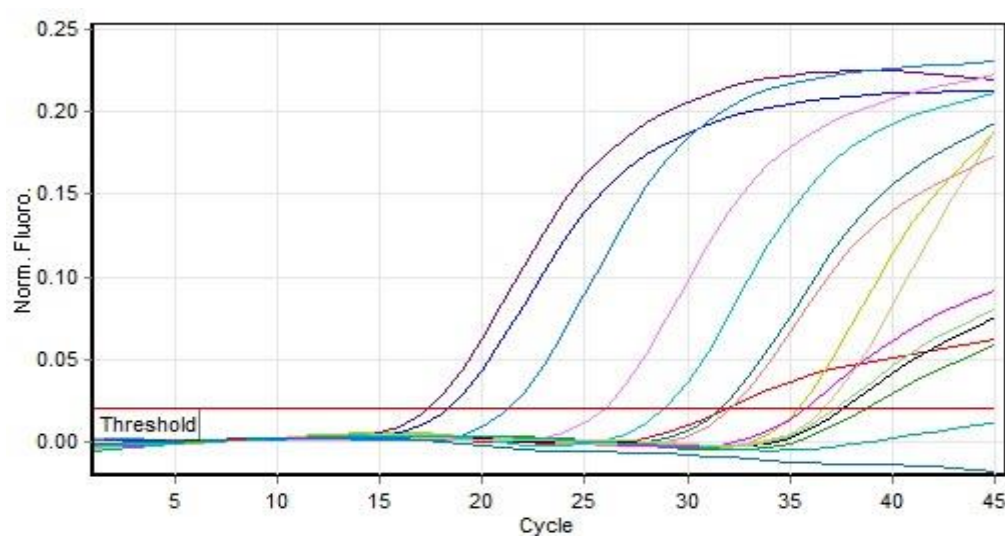
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/u)
1	Red	SI2011649-g	Unknown	17.35	1.58E+07
2	Yellow	SI2012504-g	Unknown	24.21	3.46E+05
3	Blue	SI2012991-g	Unknown	26.40	1.02E+05
4	Purple	SI2013224-g	Unknown	33.03	2.52E+03
5	Pink	SI2013294-g	Unknown	32.18	4.05E+03
6	Cyan	SI2013369-g	Unknown	25.24	1.94E+05
7	Teal	SI2013557-g	Unknown	42.53 = Neg	1.26E+01
8	Orange	SI2013711-g	Unknown		
9	Green	SI2013787-g	Unknown		
10	Magenta	DW	Negative control		
11	Black	genomic PC 1*10 ⁴	Standard	29.80	1.53E+04

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 7



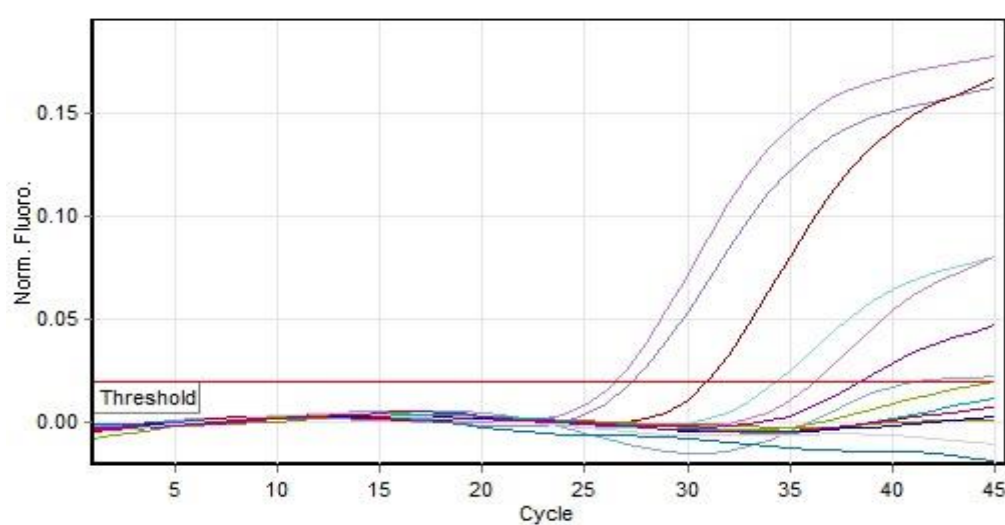
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/u)
12	■	SI2011649-sg	Unknown	23.89	4.14E+05
13	■	SI2012504-sg	Unknown	31.57	5.70E+03
14	■	SI2012991-sg	Unknown	35.60	6.00E+02
15	■	SI2013224-sg	Unknown	42.24 =Neg	1.48E+01
16	■	SI2013294-sg	Unknown		
17	■	SI2013369-sg	Unknown	33.72	1.72E+03
18	■	SI2013557-sg	Unknown		
19	■	SI2013711-sg	Unknown		
20	■	SI2013787-sg	Unknown		
21	■	DW	Negative control		
22	■	subgenomic PC 1*10 ³	Standard	34.11	1.38E+03

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 8



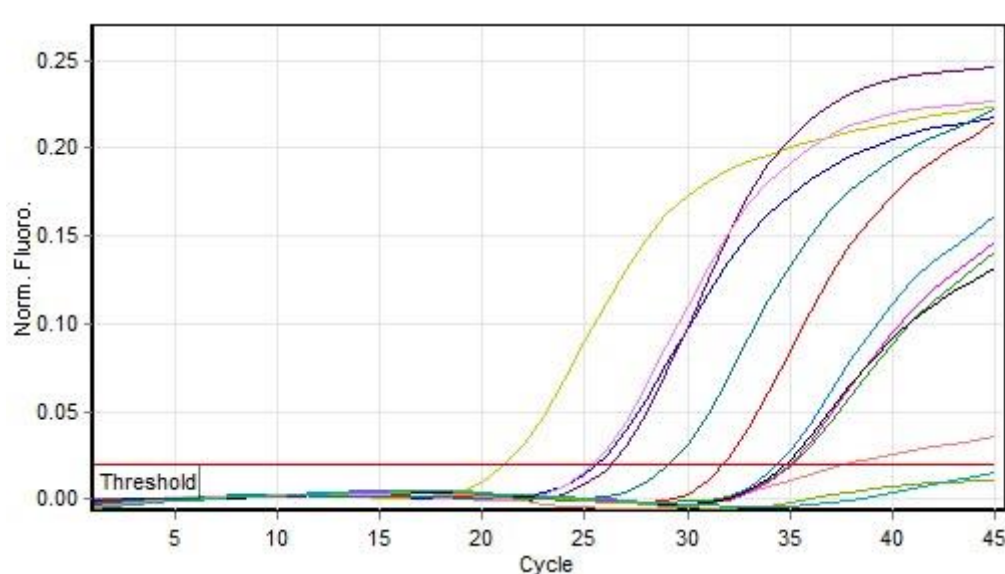
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc (copies/u)
1	Red	PC 1*10 4-g	Standard	31.88	1.00E+04
2	Blue	SI2012803-g	Unknown	18.29	1.96E+07
3	Purple	SI2012841-g	Unknown	17.33	3.35E+07
4	Pink	SI2012974-g	Unknown	25.95	2.74E+05
5	Light Blue	SI2013064-g	Unknown	21.29	3.69E+06
6	Teal	SI2013205-g	Unknown	31.62	1.16E+04
7	Light Red	SI2013273-g	Unknown	32.11	8.78E+03
8	Green	SI2013350-g	Unknown	38.68	2.25E+02
9	Magenta	SI2013385-g	Unknown	35.70	1.19E+03
10	Black	SI2013542-g	Unknown	37.61	4.08E+02
11	Cyan	SI2013739-g	Unknown	28.84	5.44E+04
12	Dark Teal	SI2013677-g	Unknown		
13	Dark Blue	SI2013881-g	Unknown		

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 8



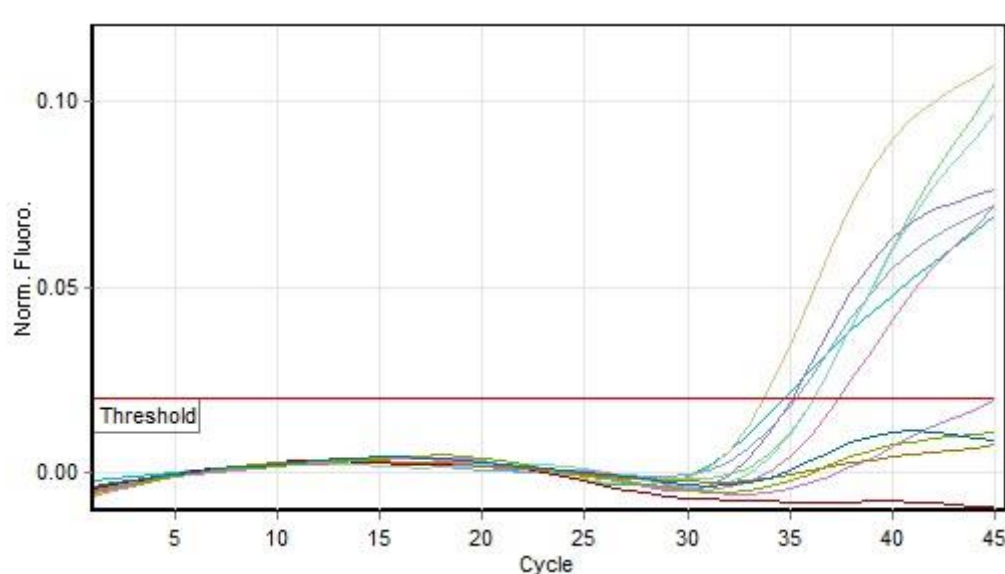
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc. (copies/ul)
15	Light Blue	PC 1*10 3-sg	Standard	34.41	1.00E+03
16	Dark Blue	SI2012803-sg	Unknown	27.34	7.13E+04
17	Light Purple	SI2012841-sg	Unknown	26.51	1.18E+05
18	Pink	SI2012974-sg	Unknown	36.27	3.24E+02
19	Red	SI2013064-sg	Unknown	30.97	7.99E+03
20	Brown	SI2013205-sg	Unknown		
21	Green	SI2013273-sg	Unknown	44.94 =Neg	1.72E+00
22	Teal	SI2013350-sg	Unknown		
23	Blue	SI2013385-sg	Unknown		
24	Dark Blue	SI2013542-sg	Unknown		
25	Purple	SI2013739-sg	Unknown	38.45	8.68E+01
26	Magenta	SI2013677-sg	Unknown		
27	Grey	SI2013881-sg	Unknown		

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 9



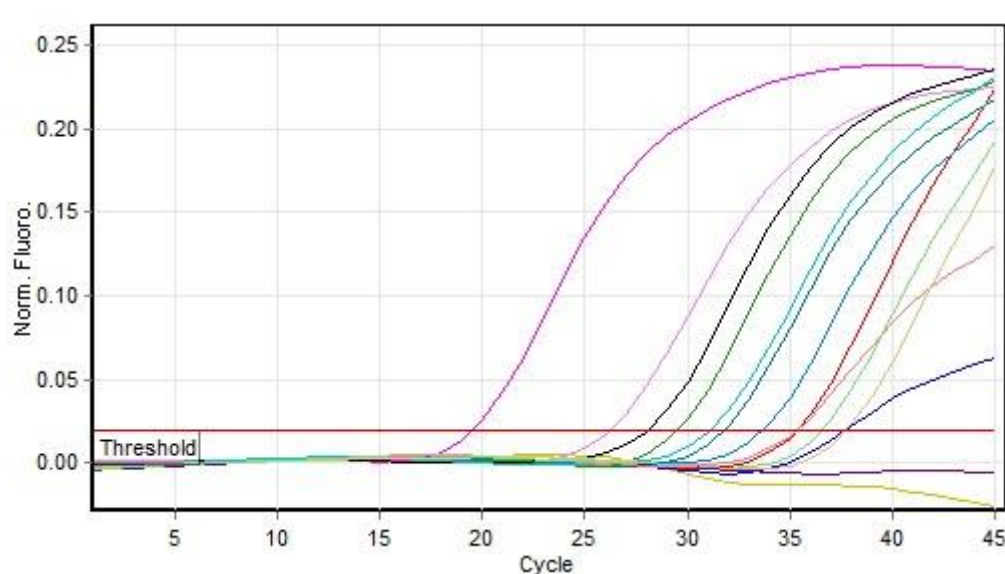
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc. (copies/u)
1	Red	genomic PC 1*10 ⁴	Standard	31.74	1.00E+04
2	Yellow	SI2011180-g	Unknown	21.17	3.65E+06
3	Blue	SI2011522-g	Unknown	25.60	3.08E+05
4	Purple	SI2011597-g	Unknown	26.29	2.09E+05
5	Pink	SI2011715-g	Unknown	25.44	3.37E+05
6	Light Blue	SI2012111-g	Unknown	34.44	2.23E+03
7	Teal	SI2012470-g	Unknown	29.15	4.24E+04
8	Light Red	SI2013688-g	Unknown	37.78=Neg	3.45E+02
9	Green	SI2013288-g	Unknown	35.10	1.53E+03
10	Black	SI2012772-g	Unknown	34.77	1.84E+03
11	Olive	SI2013748-g	Unknown		
12	Dark Teal	DW	Negative control		

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 9



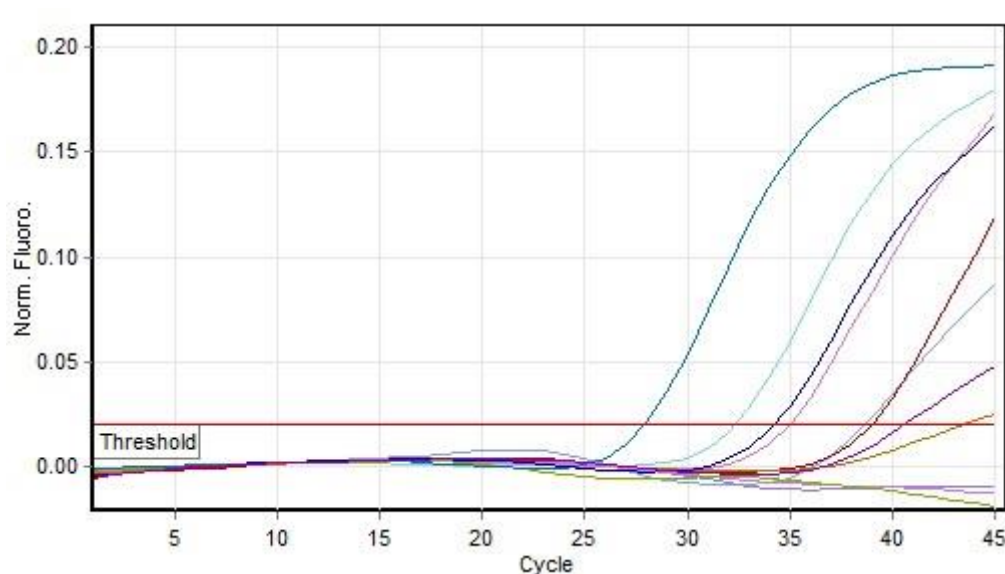
No.	Color	Name	Type	Ct	Calc. (copies/ul)
13	■	subgenomis PC 1*10 ³	Standard	34.69	1.00E+03
14	■	SI2011180-sg	Unknown	33.77	1.74E+03
15	■	SI2011522-sg	Unknown	36.14	4.17E+02
16	■	SI2011597-sg	Unknown	36.17	4.09E+02
17	■	SI2011715-sg	Unknown	35.26	7.10E+02
18	■	SI2012111-sg	Unknown	35.07	7.96E+02
19	■	SI2012470-sg	Unknown		
20	■	SI2012772-sg	Unknown	37.42	1.93E+02
21	■	SI2013288-sg	Unknown		
22	■	SI2013688-sg	Unknown		
23	■	SI2013748-g	Unknown		
24	■	DW	Negative control		

ผลการตรวจหา genomic RNA ของผู้ป่วยหมายเลข 10



No.	Color	Name	Type	Ct	Calc. (copies/ul)
1	Red	genomic PC 1*10	Standard	35.40	1.00E+03
2	Yellow	SI2013554-g	Unknown		
3	Blue	SI2013289-g	Unknown	37.74	2.70E+02
4	Purple	SI2013679-g	Unknown		
5	Pink	SI2011529-g	Unknown	26.27	1.62E+05
6	Light Blue	SI2011596-g	Unknown	33.76	2.48E+03
7	Teal	SI2011716-g	Unknown	31.85	7.24E+03
8	Light Red	SI2012985-g	Unknown	35.36	1.02E+03
9	Green	SI2012782-g	Unknown	29.57	2.58E+04
10	Magenta	SI2012575-g	Unknown	19.56	6.85E+06
11	Black	SI2012288-g	Unknown	28.10	5.84E+04
12	Cyan	SI2011976-g	Unknown	31.16	1.06E+04

ผลการตรวจหา subgenomic RNA leader ของผู้ป่วยหมายเลข 10



No.	Color	Name	Type	Ct	Calc. (copies/ul)
13	Teal	SI2011529-sg	Unknown	32.35	4.85E+03
14	Blue	SI2011976-sg	Unknown	38.64	1.09E+02
15	Purple	SI2012985-sg	Unknown		
16	Pink	SI2013289-sg	Unknown		
17	Light Pink	SI2012782-sg	Unknown	34.96	1.00E+03
18	Red	SI2011716-sg	Unknown	38.99	8.76E+01
19	Brown	SI2013554-sg	Unknown	43.47 =Neg	5.85E+00
20	Green	SI2013679-sg	Unknown		
21	Dark Blue	SI2012575-sg	Unknown	27.89	7.19E+04
22	Dark Blue	SI2012288-sg	Unknown	34.27	1.52E+03
23	Purple	SI2011596-sg	Unknown	40.59 =Neg	3.34E+01

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสินินาถ เพชรราช
วัน เดือน ปี เกิด	4 มกราคม 2530
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลเชียงคำ จังหวัดพะเยา
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วท.บ.) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2552 ปัจจุบันศึกษาต่อปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	515/129 หมู่บ้านใกล้เคียง ทาวน์ พหลโยธิน-ลำลูกกา หมู่ที่ 3 ซอย พหลโยธิน 19 ตำบลคูคต อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี