Portable mini PCR และเครื่องตรวจสอบสารพันธุกรรม Isothermal แบบภาคสนาม

ความเป็นมา

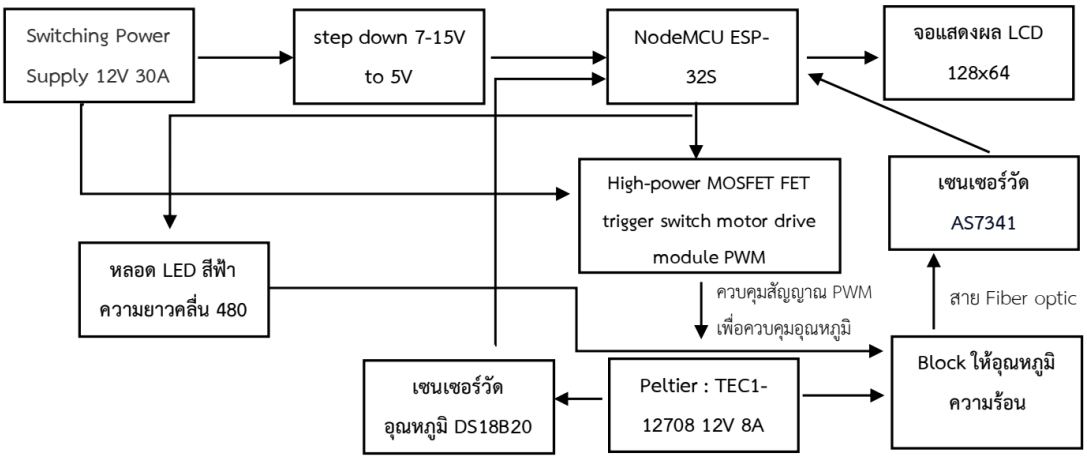
ปัญหา : การแพร่ระบาดของโรคสัตว์และการติดต่อของโรคสัตว์สู่คนเป็นปัญหาที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคที่ก่อความรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตที่สูง วิธีการทดสอบที่ให้ผลที่รวดเร็วแบบ Point of care testing (PoCT) จึงมีบทบาทอย่างมากในการช่วยควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพ ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีการ PoCT โดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Isothermal Amplification เช่นวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) หรือ Recombinase polymerase amplification (RPA) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีศักยภาพสูง รวดเร็ว สามารถตรวจได้ ณ จุดที่พบโรค แต่ก็ยังพบข้อจำกัดอยู่ เช่น การอ่านผลได้หลายแบบ ทำให้สับสนในการเลือกใช้งาน ต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้ทดสอบในการแปลผล และยังจำเป็นต้องใช้เครื่องมือเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงแม้จะใช้เพียงอุณหภูมิเดียว

วัตถุประสงค์ : การจัดการองค์ความรู้ในครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อ

1. พัฒนาเครื่องมือ PoCT ต้นแบบขนาดเล็ก (Small Handheld PoCT devices) ได้แก่ 1) Portable mini PCR และ 2) เครื่องตรวจสอบสารพันธุกรรม Isothermal แบบภาคสนาม
2. ทดสอบการใช้งานโดยเลือกใช้วิธี LAMP เป็นต้นแบบ ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส LSDV จากตัวอย่าง เลือด และตุ่มเนื้อเยื่อ (Laohasatian *et al*., 2023) โดยทำการปรับวิธีและสารเคมีให้เหมาะสมกับเครื่องต้นแบบ ใช้สีฟลูออเรสเซนต์ SYBR green I ในการอ่านและติดตามผลการทดสอบ

วิธีการ

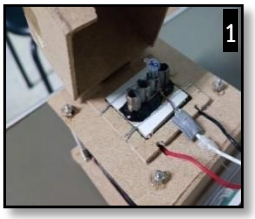
ออกแบบเครื่องมือต้นแบบ โดยใช้ระบบควบคุมการทำงานด้วยไมโครคอนโทรลเลอร์ชนิด ESP32 วัดอุณหภูมิทดสอบด้วยเซนเซอร์ชนิด DS18B20 เพื่อควบคุมอุณหภูมิ block ด้วย Peltier ผ่านสัญญาณ PWM ซึ่งควบคุมแบบ Proportional Integral Derivative Control (PID) และอ่านการเรืองแสงของสี SYBR green I ด้วยเซนเซอร์ตรวจวัดสเปกตรัมแสง AS7341 แสดงการประมวลบนจอ LCD ผ่านการสั่งงานบนอุปกรณ์โทรศัพท์มือถือ

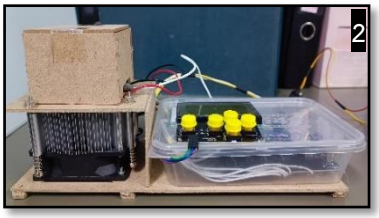


ภาพแสดงผังวงจรและระบบการทำงานเครื่องตรวจสอบสารพันธุกรรม Isothermal แบบภาคสนามต้นแบบ

ผลลัพธ์

1. Portable mini PCR

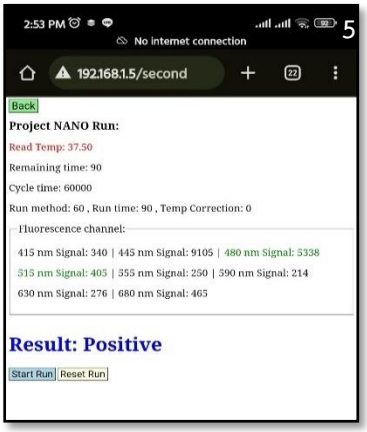


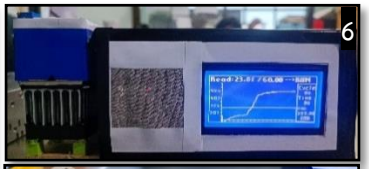


1.1 ผลการทดสอบเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ *Pasteurella multocida* ด้วยไพรเมอร์ KMT1T7 และ KMT1SP6 (Moustafa *et al*., 2013) จากชุดเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Invitrogen™ Platinum™ *Taq* DNA Polymerase ให้ผลการทดสอบขนาดดีเอ็นเอที่ถูกต้องเท่ากับ 460 bp (รูปที่ 4) ไม่พบ nonspecific band มีค่า Ramp rate เฉลี่ยประมาณ 3 °C/Sec (เครื่อง PCR ทางการค้ามีค่าเฉลี่ย 5 °C/Sec)

1.2 สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นเครื่อง PCR ขนาดเล็ก พกพาสะดวก ใช้งานง่าย ใช้เป็น heat block ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Heat lysis

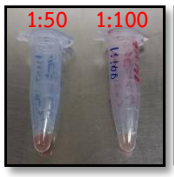
2. เครื่องตรวจสอบสารพันธุกรรม Isothermal แบบภาคสนาม





2.1 เครื่องต้นแบบใช้งานสะดวก สามารถสั่งงานและอ่านผลการทดสอบผ่านโทรศัพท์มือถือ (รูปที่ 5) มีขนาดเล็กพกพาได้ (รูปที่ 6) เจ้าหน้าที่ด้านปศุสัตว์สามารถใช้งานได้ง่าย ราคาถูก ให้ผลรวดเร็ว นำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัย ติดตามอาการ และติดตามการรักษา และควบคุมโรคที่บริเวณหน้าฟาร์มหรือจุดเกิดโรค

2.2 ผลทดสอบการใช้งานตัวอย่างจากเลือดสดเจือจาง 1 : 50 ไม่ผ่านการสกัดสารพันธุกรรมให้ผลบวกใช้เวลาน้อยกว่า 30 นาที (รูปที่ 9) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน real-time PCR ตัวอย่างผ่านการสกัดดีเอ็นเอ (รูปที่10) มีค่า Ct = 25.56 ให้ผลบวกภายในเวลา 66 นาที ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมในการที่จะพัฒนานำไปใช้จริงในภาคสนามต่อไป



การทดสอบเพื่อเพิ่มความถูกต้องของผลการทดสอบ สามารถทำการเจือจางเลือดสด 1:100 ผ่านการทำ Heat lysis ที่ 95 °C นาน 5 นาที ก่อนทำการทดสอบด้วยวิธี LAMP

ตัวอย่างคาดการว่ามีเชื้อไวรัสในปริมาณน้อยๆ (ไม่มี clinical sign) หรือพบค่า Ct จาก real-time PCR > 35 จำเป็นต้องผ่านการทำ Heat lysis ซึ่งจะให้ผลบวกระยะนานกว่า 60 นาที

นำเสนอโดย นายชัยณรงค์ กุลฉิม นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง