



แนวทางในการเก็บ และเลือกชนิดของตัวอย่างตรวจ เพื่อการวินิจฉัยโรค COVID-19

ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุรวัณณะ | คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล | นายกสมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศไทย)
นายวรวัฒน์ แดงสกุล | คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล | ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การใช้ตัวอย่างตรวจ จากทางเดินหายใจส่วนต้นเพื่อวินิจฉัยสาเหตุของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัสที่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่การตรวจพบเชื้อแบคทีเรียไม่ว่าจะพบสารพันธุกรรมแอนติเจน หรือแยกเชื้อได้ จะไม่สามารถระบุได้ว่าเชื้อนั้นเป็นสาเหตุก่อโรค ทั้งนี้เพราะเชื้อแบคทีเรียอาจ colonize อยู่โดยไม่ก่อโรค หรือบางคนอาจจะเป็นพาหะของเชื้อแบคทีเรียนั้นก็ได้ การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้ตัวอย่างตรวจจากทางเดินหายใจส่วนต้นจึงใช้ได้กับโรคติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น ส่วนการตรวจพบเชื้อไวรัสในทางเดินหายใจส่วนต้นนั้น สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่พบเป็นสาเหตุของโรค ไม่ว่าโรคนั้นจะอยู่ในทางเดินหายใจส่วนต้นหรือส่วนล่างก็ตาม ทั้งนี้เพราะเชื้อไวรัสไม่ใช่ normal flora ของมนุษย์ เชื้อไวรัสจะเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อเพิ่มจำนวน แล้วทำให้เซลล์นั้นแตกสลายในที่สุด จะมีข้อยกเว้นกับไวรัสที่ติดเชื้อแอบแฝง เช่น cytomegalovirus หรือ adenovirus เป็นต้น ซึ่งไวรัสเหล่านี้ถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนในภาวะที่ร่างกายอ่อนแอจากโรคอื่นโดยที่ตัวเองไม่ใช่เชื้อก่อโรค ตัวอย่างตรวจจากทางเดินหายใจส่วนต้นที่มีโอกาสพบเชื้อไวรัสมากที่สุดคือ nasopharyngeal (NP) wash หรือ aspirate แต่ก็เป็นตัวอย่างที่อาจก่อละอองฝอยซึ่งเป็นอันตราย จึงมีการเก็บตัวอย่างตรวจชนิดอื่นแทน ได้แก่ NP swab และ oropharyngeal หรือ throat swab เป็นต้น

ตัวอย่างตรวจเพื่อการวินิจฉัยโรค

ในสมัยที่มีการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ pandemic 2009 นั้น ตัวอย่างตรวจจากทางเดินหายใจส่วนต้นที่ใช้ในการวินิจฉัยโรค ก็คือ NP swab แต่เมื่อมีโรค MERS coronavirus เกิดขึ้น ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค สหรัฐอเมริกา ได้แนะนำให้มีการเก็บตัวอย่างตรวจ 2 ชนิดคือ NP swab และ throat swab ใส่รวมกันลงมาในหลอด viral transport media (VTM) หลอดเดียวกัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อให้มากขึ้น และเมื่อมีการระบาดของโรค COVID-19 เกิดขึ้น โดยยังไม่มีมาตรการจัดทำแนวทางสำหรับการเลือกชนิดของตัวอย่างตรวจออกมา ประเทศไทยจึงมีการเก็บตัวอย่างตรวจ 2 ชนิด ใส่ลงในหลอดเดียวกันเช่นเดิม



ที่มาของภาพ : Marty FM et al., N Engl J Med. 2020;10:1056

ความเสี่ยงของผู้เก็บตัวอย่างตรวจ

การเก็บตัวอย่าง throat swab นั้น จะมีความเสี่ยงต่อผู้เก็บตัวอย่างมากกว่าการเก็บ NP swab เพราะในการเก็บ NP swab ผู้เก็บอาจเข้าทางด้านข้างของผู้ป่วยได้ แต่ในการเก็บ throat swab ผู้เก็บจะต้องเข้าทางด้านหน้าของผู้ป่วย การป้าย peritonsil และ posterior pharynx นั้น กระตุ้นให้ผู้ป่วยรู้สึกระคายเคืองมากกว่า ดังนั้นจึงมีอยู่บ่อยครั้งที่ผู้ป่วยจะไอรด์ผู้เก็บ ทำให้การเก็บ throat swab มีความเสี่ยงค่อนข้างมาก

การเลือกชนิดของตัวอย่างตรวจ

เมื่อการระบาดของโรค COVID-19 เกิดขึ้นเป็นวงกว้าง ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค สหรัฐฯ ได้ออกแนวทางการเก็บเลือกชนิด ตลอดจนการบริหารจัดการตัวอย่างตรวจ และได้มีการทบทวนให้เหมาะสมกับสภาวะการณ์หลายครั้ง จนกระทั่งในวันที่ 14 เมษายน พ.ศ.2563 จึงได้รวบรวมแนวทางปฏิบัติสำหรับการเก็บตัวอย่างตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค COVID-19 และแนะนำว่า NP swab เป็น specimen of preferred choice สามารถใช้ได้ทั้งในการวินิจฉัยการติดเชื้อในผู้ไม่มีอาการ (asymptomatic infection) และในการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วย โดยเก็บ NP swab เพียงครั้งเดียว ซึ่งถ้าเก็บตัวอย่างตรวจได้ดี เชื้อใน NP swab ไม่น่าจะหลุดรอดจากการถูกตรวจจับด้วยน้ำยาที่มีความไวในระดับที่ตรวจจึ้นในจำนวนน้อยเพียง 1000 copy/ml ได้

ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บ NP swab ได้ ให้เก็บตัวอย่างตรวจชนิดอื่นทดแทน แต่ทั้งนี้จะต้องใช้กับผู้ที่มีอาการแล้วเท่านั้น ได้แก่ ..

- **Oropharyngeal swab** ซึ่งเก็บโดยบุคลากรทางการแพทย์ ถ้าทำการเก็บทั้ง NP swab และ oropharyngeal swab ให้ใส่ตัวอย่างทั้งสองลงใน VTM หลอดเดียวกัน หรือ
- **Nasal mid-turbinate swab** ซึ่งเก็บโดยบุคลากรทางการแพทย์ หรือผู้ป่วยทำการเก็บตัวอย่างด้วยตนเอง หรือ
- **Nasal swab (anterior nares)** ซึ่งเก็บโดยบุคลากรทางการแพทย์หรือผู้ป่วยเก็บตัวอย่างด้วยตนเอง

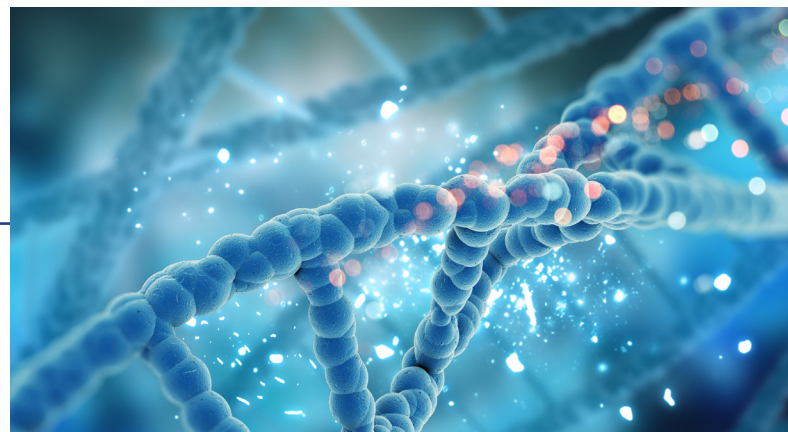
ในการเก็บตัวอย่าง จะต้องเก็บจากจมูกทั้งสองข้าง โดยใช้ flocked swab หรือ swab ปลายมน (spun swab) ซึ่งทำด้วยใยสังเคราะห์ polyester และส่วนก้านทำด้วยพลาสติก ไม่ใช่ swab ที่ทำด้วย calcium alginate หรือก้านทำด้วยไม้ เพราะอาจมีสารที่ยับยั้งปฏิกิริยา PCR หรือทำลายเชื้อไวรัสในตัวอย่างตรวจ

ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนล่าง ไอและมีเสมหะ ก็ควรส่งเสมหะตรวจด้วย ผู้ป่วยที่มีการใส่ท่อหายใจ อาจเก็บ aspirate หรือ bronchoalveolar lavage ทางเดินหายใจส่วนล่างจะมีเชื้อไวรัสในปริมาณมากกว่าใน NP swab

ตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ของประเทศไทย การทำลายฤทธิ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ในตัวอย่างตรวจจะต้องทำในห้องปฏิบัติการชีวনির্যระดับ BSL-2 enhanced และถ้าทำการเพาะเลี้ยง หรือ แยกเชื้อ จะต้องทำในห้องปฏิบัติการชีวনির্যระดับ BSL-3

การแปลผลการทดสอบ

การเก็บ NP swab หรือ throat swab นั้น ผู้เก็บจะต้องมีประสบการณ์เป็นอย่างดี มิฉะนั้นจะเก็บตัวอย่างได้ไม่มากพอ และเมื่อนำตัวอย่างตรวจมาทำการทดสอบ RT-PCR ก็จะได้ผลทดสอบที่เชื่อถือไม่ได้ เช่น ถ้าทำการตรวจผู้ติดเชื้อแล้วได้ผลเป็นลบ ซึ่งความจริงแล้วก็คือผลลบปลอมนั่นเอง ผลเสียก็คือ ผู้ติดเชื้อจะพลาดโอกาสในการได้รับการดูแลรักษา และจะไม่มีการควบคุมโรค ทำให้เชื้อแพร่กระจายต่อไปอีก โดยธรรมชาติของไวรัสจะต้องทำการเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่มีชีวิต แล้วจึงปล่อยอนุภาคไวรัสรุ่นลูกออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อ ไวรัสที่ถูกปล่อยออกมานั้น ส่วนหนึ่งจะถูกทำลายด้วยความเป็นกรดของน้ำมูกหรือความแห้งของอากาศที่หายใจเข้าไปในจมูก ถ้าผู้เก็บตัวอย่างไม่สามารถ swab แรง ๆ เพื่อถูเซลล์ให้หลุดออกจากผนังจมูก ก็จะได้แต่น้ำมูกใส ๆ อยู่ที่ปลาย swab เท่านั้น



ในช่วงที่มีการระบาด

ของโรคไข้หวัดนก H5N1 หรือไข้หวัดใหญ่ pandemic 2009 การทำ RT-PCR จะมีการตรวจหาชิ้นบางชนิด เช่น GAPDH หรือ RNase P (RNP) เป็นต้น เพื่อทำหน้าที่เป็น housekeeping gene ควบคู่ไปกับการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสด้วย housekeeping gene คือ ยีนของเซลล์ที่จะต้องมีการแสดงออกตลอดเวลา เพราะต้องทำหน้าที่ในการสร้าง RNA เพื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนซึ่งเซลล์ต้องใช้ในการดำรงชีวิต การแสดงออกของ housekeeping gene จะเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอไม่ว่าเซลล์นั้นจะอยู่ภายใต้สภาวะใดก็ตาม ดังนั้นในการทดสอบ RT-PCR ถ้าตรวจพบ housekeeping gene ด้วย ก็จะอนุมานว่าตัวอย่างตรวจนั้นน่าจะเก็บเซลล์ที่ติดเชื้อออกมาได้ด้วย แปลว่าตัวอย่างตรวจมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับ

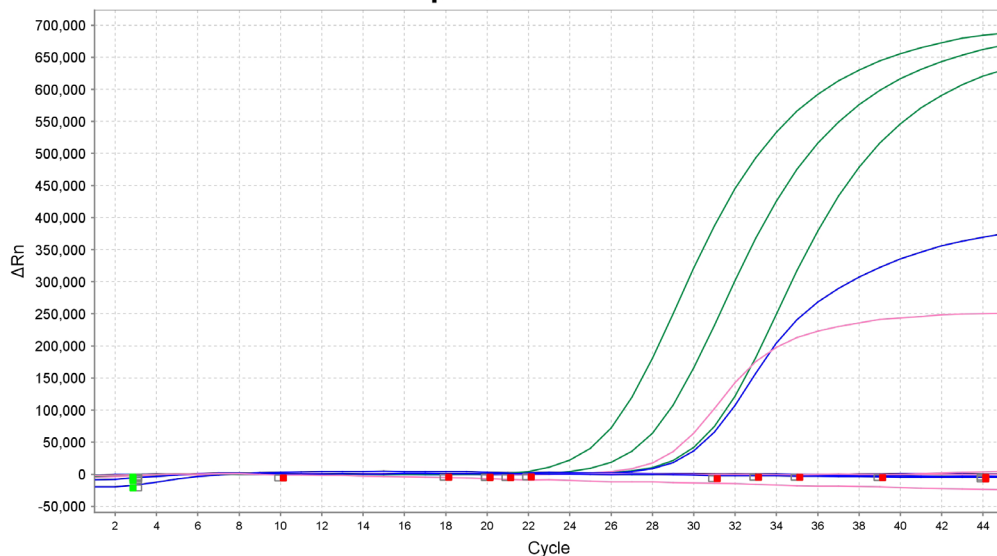
ผลการตรวจ housekeeping gene จึงถูกนำมาใช้เพื่อประกอบการแปลผลการตรวจหาจีโนมของไวรัสด้วย กล่าวคือ ถ้าตรวจพบ housekeeping gene โดยตรวจไม่พบจีโนมของไวรัส ก็จะมีเชื่อมั่นในระดับสูงว่าผู้นั้นไม่มีการติดเชื้อ จะรายงานผลเป็น virus genome not detected แต่ถ้าตรวจไม่พบยีนนี้ จะแปลว่าผลการทดสอบนั้นเชื่อถือไม่ได้ (invalid result) เนื่องจากตัวอย่างตรวจมีปริมาณไม่เพียงพอ (inadequate specimen) ที่จะตัดสินการทดสอบ จะแนะนำให้เก็บตัวอย่างตรวจมาใหม่ แต่ถ้าตรวจพบจีโนมของไวรัสแม้ housekeeping gene จะเป็นลบก็ให้รายงานผลการทดสอบได้ว่า “virus genomes detected” ซึ่งจะเห็นได้ว่าคุณภาพของสิ่งส่งตรวจจะเป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลถึงความไว (sensitivity) ของวิธี RT-PCR ด้วย

ในขณะนี้ห้องปฏิบัติการเพียงไม่กี่แห่งที่มีการทดสอบ housekeeping gene ควบคู่ไปกับการตรวจหาจีโนมของไวรัส เช่น

ห้องปฏิบัติการของคณะเทคนิคการแพทย์ ม.มหิดล, คณะเทคนิคการแพทย์ ม.เชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการในความดูแลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ในปัจจุบันมีการใช้ commercial kits หลากหลายยี่ห้อ รวมทั้งมีการนำเครื่อง automated มาใช้ในการตรวจหาจีโนมของ SARS-CoV-2 แต่ kits และ automated เหล่านี้ส่วนใหญ่จะไม่มีมีการตรวจหา housekeeping gene ร่วมด้วย ดังนั้นผู้เก็บ NP swab ควรได้รับการฝึกฝนจนมีประสบการณ์เป็นอย่างดี เพื่อไม่ให้เกิดการแปลผลการทดสอบผิดพลาด

Amplification Plot



■ RNP ■ E-Sarbeco ■ NIH-TH8

เอกสารอ้างอิง

- 1 CDC. Interim guidelines for collecting, handling, and testing clinical specimens from persons for coronavirus disease 2019 (COVID-19) (Updated April 14, 2020). Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> (accessed on 14 Apr 2020)
- 2 CDC. MERS-CoV: Interim guidelines for clinical specimens from PUI. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/guidelines-clinical-specimens.html> (accessed on 14 Apr 2020)
- 3 Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- 4 Marty FM, Chen K, Verrill KA. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen. N Engl J Med. 2020;10.1056/NEJMc2010260. doi:10.1056/NEJMc2010260