กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019

- การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2)
- การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2)
- การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2)

DMSc

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019

DMSc

คำนำ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus Disease 2019; COVID-19) เดิมเรียกว่า โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (novel coronavirus 2019, 2019-nCoV) พบรายงานผู้ป่วยโรคปอดอักเสบไม่ทราบสาเหตุครั้งแรก เมื่อวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2562 (ค.ศ. 2019) ที่เมืองอู่ฮั่น มณฑลเหอเป่ย์ สาธารณรัฐประชาชนจีน ต่อมาวันที่ 3 มกราคม พ.ศ. 2563 (ค.ศ. 2020) มีรายงานอย่างเป็นทางการว่าโรคปอดอักเสบที่ระบาดที่อู่ฮั่น มีสาเหตุจากไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 และพบการแพร่เชื้อจากคนสู่คน โดยสถานการณ์ได้เริ่มจากเมืองอู่ฮั่น ต่อมาพบผู้ป่วยติดเชื้อในทุกมณฑลของจีน และปัจจุบันพบการะบาดของโรคมากกว่า 185 ประเทศทั่วโลก ประเทศไทยพบผู้ป่วยติดเชื้อรายแรกเป็นหญิงชาวจีนที่เดินทางมาเที่ยวเมืองไทย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์สามารถถอดรหัสพันธุกรรมทั้งยีโนมของไวรัสจากตัวอย่างผู้ป่วยรายแรกนี้ด้วยเครื่อง Next generation sequencing (NGS) ได้เป็นผลสำเร็จ เมื่อวันที่ 11 มกราคม พ.ศ.2563 ซึ่งเป็นการประสานงานร่วมกับศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ สภากาชาดไทย (TRC-EID) และเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของประเทศไทย สองแห่งเท่านั้นที่ตรวจยืนยันผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019

กระทรวงสาธารณสุขได้ยกระดับศูนย์ปฏิบัติการภาวะฉุกเฉินเป็นระดับกระทรวงสาธารณสุข เพื่อติดตามสถานการณ์โรคทั้งในประเทศและต่างประเทศอย่างใกล้ชิดและเสริมสร้างความเข้มแข็งของระบบการเฝ้าระวังค้นหาผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 โดยการทำงานแบบบูรณาการทุกกระทรวงรวมทั้งประสานงานกับองค์การอนามัยโลกและประเทศในอาเซียน เพื่อการดำเนินการอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยมาตรฐานระดับสูงสุดในการป้องกันควบคุมโรคติดต่อ และได้มอบหมายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้พัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยให้มีประสิทธิภาพ แม่นยำ รวดเร็ว เพื่อให้ทันต่อการรักษาผู้ป่วยและการควบคุมโรค และถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยให้กับห้องปฏิบัติการเครือข่าย ซึ่งประกอบด้วยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัย กรมควบคุมโรค กรมการแพทย์ โรงพยาบาลทั้งภาครัฐและเอกชน โดยห้องปฏิบัติการเครือข่ายต้องผ่านการตรวจประเมินพื้นที่ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ ความปลอดภัยด้านชีวภาพ การประเมินบุคลากร และการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน ก่อนจะเปิดบริการตรวจได้ ปัจจุบันการขยายเครือข่ายห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ***ดำเนินงานตามนโยบาย 1 จังหวัด 1 แล็บ 100 ห้องปฏิบัติการ รายงานผลใน 1 วัน*** ผลการดำเนินงานในปัจจุบันได้บรรลุเป้าหมายดังกล่าว โดยมีจำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองทั่วประเทศทั้งภาครัฐและเอกชนมากกว่า 250 แห่ง ที่สามารถให้บริการตรวจ COVID-19 ซึ่งมั่นใจได้ว่าสามารถรองรับสถานการณ์การระบาดของโรค ทั้งการระบาดที่เกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศ และพบการระบาดที่แม่สอด จ.ตากในเดือนตุลาคม 2563 ช่วงต้นเดือนธันวาคม 2563 พบการแพร่ระบาดอันเนื่องมาจากคนไทยที่ข้ามไปทำงานที่สถานบริการฝั่งท่าขี้เหล็ก รัฐฉาน สาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมาร์ (พม่า) ลักลอบเดินทางเข้าประเทศผ่านช่องทางธรรมชาติใน อ.แม่สาย และ อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย แพร่กระจายถึงเชียงใหม่ส่งผลกระทบต่อภาคการท่องเที่ยวในพื้นที่ภาคเหนืออย่างมาก และล่าสุดจากสถานการณ์ผู้ติดเชื้อโควิดระลอกใหม่ที่ จ.สมุทรสาคร จากแรงงานต่างชาติซึ่งพบการระบาดตั้งแต่วันที่ 15 ธันวาคม 2563 จนถึงปัจจุบัน ที่รุนแรงและกระจายเป็นวงกว้าง พบผู้ติดเชื้อใน 62 จังหวัด ทำให้ประเทศไทยมีผู้ป่วยยืนยันสะสม 12,795 ราย เสียชีวิตสะสม 71 ราย (ข้อมูล ณ วันที่ 21 มกราคม 2564) สำหรับสถานการณ์การติดเชื้อทั่วโลก มีผู้ติดเชื้อรวม 97,306,536 ราย เสียชีวิต 2,083,257 ราย

คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโรคโรนา 2019 เล่มนี้ ประกอบด้วยองค์ความรู้ของไวรัส วิธีการตรวจวินิจฉัย การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจ ความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน หลักเกณฑ์การประเมินคุณภาพชุดตรวจ แนวทางการจัดตั้งห้องปฏิบัติการ และเนื้อหาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่า คู่มือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์แก่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทุกระดับ เจ้าหน้าที่สอบสวนโรค และบุคลกรจากหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ประโยชน์ และเป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คณะกรรมการเตรียมความพร้อมและตอบโต้ภาวะฉุกเฉินด้านห้องปฏิบัติการ
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
มกราคม 2564

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	
การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019	1
การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2)	2
การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2)	9
การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2)	10
บทสรุป	15
เอกสารอ้างอิง	16

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus Disease 2019; COVID-2019)

ไวรัสกลุ่มโคโรนา (Coronaviruses) เป็นไวรัสกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมา เนื่องจากก่อให้เกิดโรคระบาดรุนแรงถึง 3 ครั้ง นับตั้งแต่การระบาดของโรคซาร์หรือโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง ที่เคยระบาดในเอเชีย เมื่อปี พ.ศ. 2545 – 2546 (ค.ศ. 2002-2003) และโรคเมอร์ส หรือโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง ที่พบในตะวันออกกลาง และระบาดใน 27 ประเทศทั่วโลก เมื่อปี พ.ศ. 2557 (ค.ศ. 2012) และล่าสุดโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือ โควิด 19 หากทบทวนการค้นพบไวรัสสายพันธุ์ใหม่ ทั้ง 3 สายพันธุ์จะพบว่าแพทย์และนักวิทยาศาสตร์ได้ใช้ความพยายามในการบูรณาการศาสตร์ต่างๆเพื่อค้นหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค เนื่องจากการใช้วิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อที่คาดว่าเป็นสาเหตุของโรคแทบทุกชนิดให้ผลเป็นลบ จึงต้องกลับมาใช้วิธีการตรวจแบบคัดกรองเป็นกลุ่มเชื้อหรือตระกูล ที่เรียกว่า Family PCR พร้อมกับใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ศึกษารูปร่างของเชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วย จากผลผลิตของ Family PCR และการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน จึงทราบเบื้องต้นว่าเป็นไวรัสกลุ่มโคโรนา เนื่องจากมีลักษณะพิเศษ มีปุ่ม (spikes) ยื่นออกจากอนุภาคไวรัส คล้ายมงกุฎล้อมรอบ เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าป็นเชื้อโคโรนาสายพันธุ์ใหม่หรือไม่? เชื้อในตัวอย่างของผู้ป่วยได้นำมาถอดรหัสพันธุกรรมด้วยวิธี Conventional DNA sequencing และ Next Generation Sequencing (NGS) จนทราบว่าเป็นไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ นอกจากนี้ยังนำตัวอย่างผู้ป่วยมาแยกเชื้อเพื่อการศึกษาวิจัยในด้านต่างๆ เช่น Genomic evolution, antiviral resistance markers, circulation of antigenic variants, gene reassortment , development of anti-viral and vaccine เป็นต้น

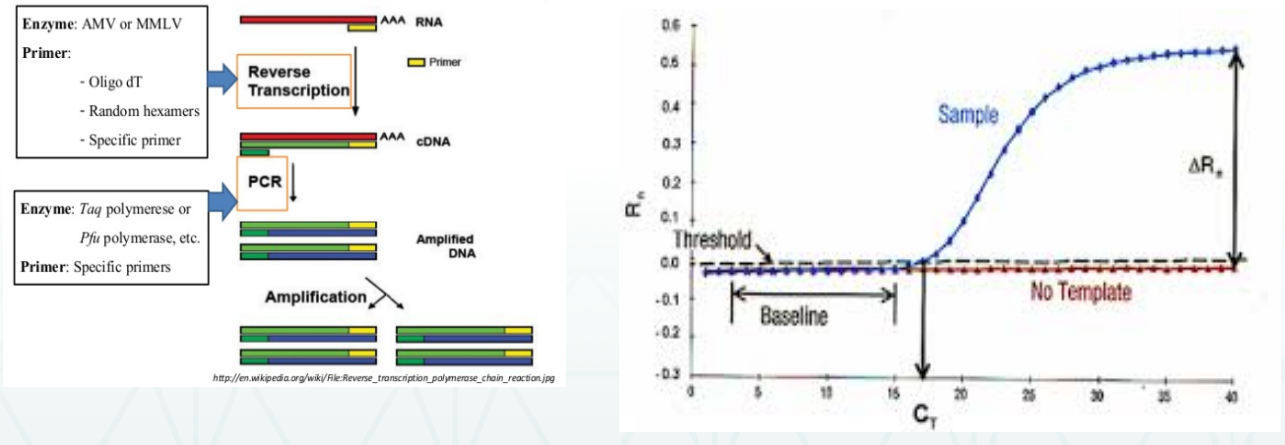
การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสโคโรนา 2019 ในผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคติดต่ออุบัติใหม่ สภากาชาดไทย (TRC-EID) เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงที่ร่วมมือกันในการตรวจยืนยันผู้ป่วยสงสัยติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ในระยะแรกๆ โดยตัวอย่างสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยรายแรกซึ่งเป็นหญิง ชาวจีน อายุ 61 ปี เดินทางมาจากเมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย ประเทศจีน ได้นำส่งมายัง ห้องปฏิบัติการทั้ง 2 แห่ง และดำเนินการตรวจคัดกรองไวรัสและแบคทีเรียที่สำคัญหลายชนิดที่ก่อโรคติดเชื้อทางเดินหายใจ ด้วยวิธี Multiplex realtime PCR และ Family PCR พบเป็นเชื้อในกลุ่มโคโรนา จึงทำการถอดรหัสพันธุกรรมต่อเพื่อให้ทราบถึงสายพันธุ์ด้วยเครื่อง Next Generation Sequencing (NGS) เมื่อวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม เปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมในธนาคารรหัสพันธุกรรมโลก (Genbank) แล้วพบว่า ไวรัสดังกล่าวคล้ายคลึงกับ Bat SARS-like Coronavirus แต่เป็นสายพันธุ์ใหม่ โดยผลการวิเคราะห์นี้ห้องปฏิบัติการทั้ง 2 แห่ง ใช้เวลาเพียง 2 วัน และต่อมาเมื่อประเทศจีนได้รายงานรหัสพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ใหม่นี้ ผลของลำดับสารพันธุกรรมทั้งเส้นของเชื้อจากผู้ป่วยรายนี้คือ hCoV-19/Thailand/61/2020 (Accession ID:EPI_ISL_403962) เมื่อนำมาเปรียบเทียบแล้วพบว่ายีโนมทั้งเส้นมีความเหมือนกับยีโนมของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจากเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน hCoV-19/Wuhan/IPBCAMSWH-01/2019 (Accession ID:EPI_ISL_402123) ร้อยละ 100

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทางห้องปฏิบัติการ

1.การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2)

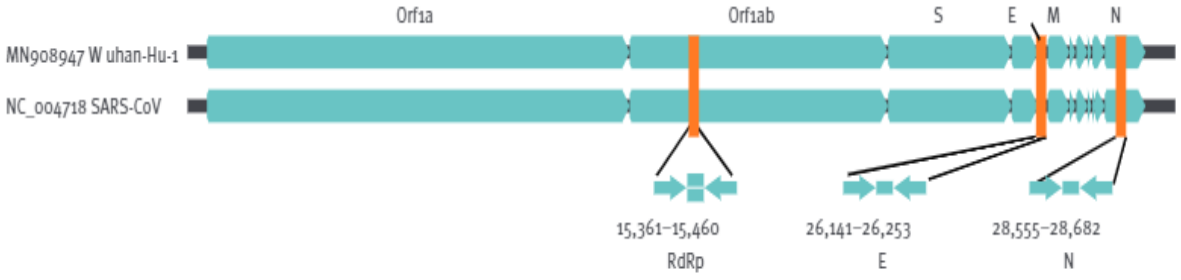
ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ปัจจุบันมีวิธีหรือชุดน้ำยา ที่หลากหลายแต่ส่วนใหญ่ ใช้หลักการ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อที่ตายแล้ว หรือเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งมีปริมาณอยู่น้อยมากในตัวอย่างสารคัดหลั่งทางเดินหายใจส่วนบน ส่วนล่าง เลือด อุจจาระ ของผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อการรักษาที่รวดเร็ว อย่างไรก็ดี แม้จะมีความไวสูง แต่อาจเกิดผลลบปลอม (false negative) ได้หากเก็บตัวอย่างไม่ถูกวิธี ถูกตำแหน่ง และในระยะเวลาที่เหมาะสม การตรวหาสารพันธุกรรม ของเชื้อมีหลายเทคนิคด้วยกัน เช่น

1.1 เทคนิค realtime RT-PCR วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ และใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะสูง ทราบผลภายใน 2-3 ชั่วโมง ประมาณร้อยละ 90 ของชุดน้ำยาที่จำหน่ายทั่วโลก ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ขั้นตอนการทดสอบคือ ใช้ชุดน้ำยาสกัดยีโนมของไวรัสซึ่งเป็นชนิด RNA จากตัวอย่างผู้ป่วย จากนั้นสังเคราะห์ RNA เป็น cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase เพิ่มจำนวน DNA ส่วนที่ต้องการตรวจสอบด้วยน้ำยาที่มี polymerase Tag enzyme, primers และprobes ที่จำเพาะกับไวรัส SARS-CoV-2 และติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติ (realtime PCR) ทำอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA และตรวจวัด DNA ของไวรัสที่เพิ่มขึ้น ผ่านระบบ detection unit วัดความเข้มของแสงซึ่งประกอบด้วย emission filter , excitation filter และ analysis software สำหรับคำนวณและวิเคราะห์ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ แสดงออกมาเป็นรูปกราฟหรือตัวเลขความเข้มของแสงในแต่ละรอบของปฏิกิริยา สามารถอ่านผลเป็นปริมาณไวรัส หรือพบ/ไม่พบไวรัส



รูปที่ 1 แสดงหลักการการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค realtime RT-PCR
ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction.jpg

ปัจจุบันมีชุดน้ำยา realtime RT-PCR ออกวางจำหน่ายทั่วโลกมากกว่าร้อยยี่ห้อ ต่างกันด้วย primers และ probes ที่ออกแบบมาจำเพาะต่อยีนที่ตำแหน่งต่างๆกัน เช่น บางบริษัท มี primers และ probes ที่จำเพาะต่อ E ยีนของไวรัสโคโรนาในกลุ่ม Sarbecovirus (SARS-CoV-1 และ SARS-CoV-2) รวมกับ primers และ probes ที่มีความจำเพาะกับ SARS-CoV-2 แต่ชุดน้ำยาโดยส่วนใหญ่มีเฉพาะ primers และ probes จำเพาะต่อยีน SARS-CoV-2 ที่ตำแหน่งต่างๆกันไปตั้งแต่ 1 จนถึง 3 ตำแหน่ง เช่น ORF- 1a, ORF- 1b **และ** ORF-1ab ที่ encode nonstructural protein (nsp) และส่วนที่ encode structural protein ได้แก่ S (spike), E (envelope), M (membrane) และ N (nucleocapsid) นอกจากนี้บางบริษัทได้ผลิตชุดน้ำยาพร้อมเครื่องทำปฏิกิริยา ที่เรียกกันว่า เครื่อง Fully automate เช่น เครื่อง Cobas SARS-CoV-2, Roche เครื่องมือจะทำงานได้เองอัตโนมัติตั้งแต่กระบวนการสกัดจนถึงการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ตรวจได้ตั้งแต่ 96-384 ตัวอย่างต่อรอบ



รูปที่ 2 แผนผังแสดงตำแหน่งยีนต่างๆของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่เลือกมาใช้ในการออกแบบ primers/probes สำหรับวิธี Real-time RT-PCR ,E: envelope protein gene; M: membrane protein gene; N: nucleocapsid protein gene; ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase gene; S: spike protein gene

ที่มา: www.eurosurveillance.org

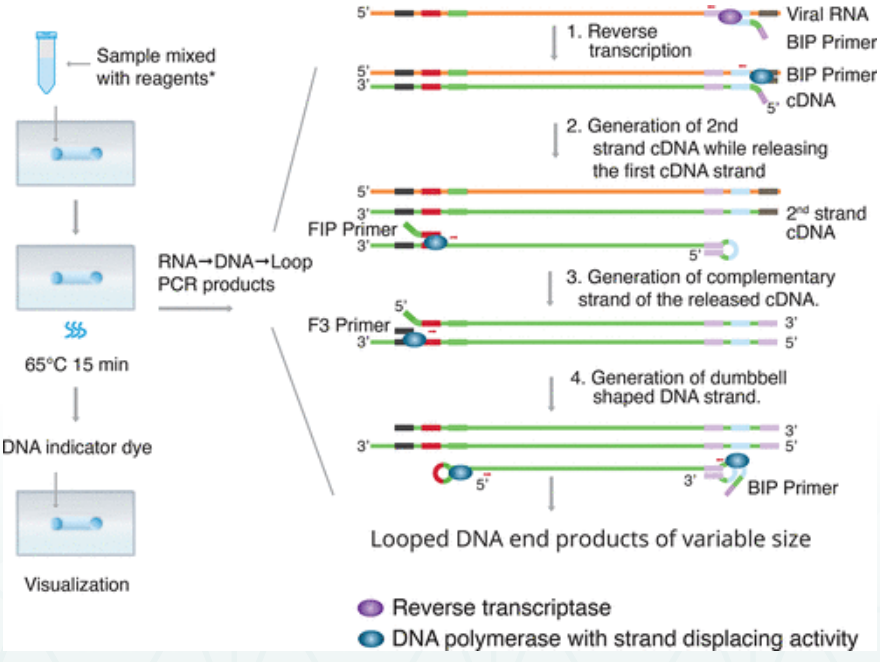
แม้ว่า realtime PCR จะเป็นวิธีที่ใช้แพร่หลาย แต่ยังต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะเช่นเครื่องสกัดสารพันธุกรรม เครื่องทำปฏิกิริยา realtime PCR และระดับความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการที่เหมาะสม (BSL2 enhanced) ปัจจุบันเทคโนโลยีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค realtime RT-PCR มีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว การสกัดและการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมสามารถทดสอบเบ็ดเสร็จในหลอดน้ำยาเดียวกัน จึงลดการปนเปื้อนที่เป็นสาเหตุของการเกิดผลบวกปลอม (False positive) รวมถึงการลดเวลากระบวนทดสอบทำให้รายงานผลได้รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังใช้เครื่องมือขนาดเล็กเพียงเครื่องเดียว ที่สะดวกในการติดตั้ง ใช้พื้นที่เพียงเล็กน้อย เหมาะสำหรับการจัดตั้งในโรงพยาบาลหรือที่เรียกว่าการตรวจ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (POCT: point of care testing) แต่ยังคงมีข้อจำกัดที่แต่ละรอบการทำงาน สามารถทดสอบตัวอย่างได้จำนวนน้อยหรือต่ำกว่า 10 ตัวอย่าง เช่น Xpert Xpress SARS-CoV-2, Cepheid ตรวจได้ 4 ตัวอย่างต่อรอบใช้เวลา 35 นาที QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel, QIAGEN ใช้เทคนิค multiplex realtime PCR ตรวจหาไวรัสและแบคทีเรียได้เพิ่มอีก 22 ชนิดโดยตรวจได้ 1 ตัวอย่างต่อรอบใช้เวลา 60 นาที และล่าสุด CovidNudge ที่บริษัท DNANudge ในประเทศอังกฤษได้ปรับรูปแบบจากชุดตรวจหา human DNA typing มาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีชื่อทางการค้าว่า CovidNudge ประกอบด้วย DnaCartridge เป็นตลับทดสอบที่แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนสกัดตัวอย่าง (sample preparation) และส่วนทำปฏิกิริยา realtime PCR (amplification unit) เมื่อใส่ไม้สวอปเข้าในตลับแล้วจึงนำไปวางในกล่อง NudgeBox เพื่อเริ่มกระบวนการทดสอบ CovidNudge มีความไว (sensitivity) ประมาณ 94% และความจำเพาะ (specificity) ประมาณ 100% เมื่อเทียบกับ standard realtime RT-PCR โดยใช้เวลา 90 นาที ในการตรวจ 1 ตัวอย่าง

รูปที่ 3 แสดงชุดตรวจ CovidNudge ประกอบด้วย DnaCartridge (ตลับสีน้ำเงิน) และ กล่อง NudgeBox
ที่มา: https://scitechdaily.com/covidnudge-rapid-90-minute-covid-19-test-shown-to-be-highly-accurate/

1.2 เทคนิค Isothermal Nucleic Acid Amplification ใช้หลักการ เพิ่มจำนวน DNA ได้ต่อเนื่องที่อุณหภูมิเดียว (isothermal amplification) เนื่องจาก DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากเอ็มไซม์ที่ใช้ใน วิธี Realtime RT-PCR จึงไม่ต้องอาศัยเครื่อง realtime PCR เพิ่มและลดอุณหภูมิเป็นรอบๆ ทำให้ใช้เวลาสั้นลงมาก น้ำยาราคาถูก จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 มากขึ้น เทคนิคนี้แบ่งย่อยออกเป็นหลายวิธี เช่น

1.2.1 วิธี Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในบรรดา Isothermal Nucleic Acid Amplification โดยการเพิ่มเติมขั้นตอนการเปลี่ยน RNA เป็นcDNA และใช้ primer ที่ออกแบบจำเพาะขึ้นมา 3 คู่ (ต่างจาก PCR ที่ปกติใช้ 1 คู่) เพื่อสร้าง DNA fragments การอ่านผล สามารถดูด้วยตาเปล่า จากความขุ่นซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของ Magnesium pyrophosphate ที่เกิดจากการรวมกันของ pyrophosphate ion จาก dNTPs กับ magnesium ion จาก LAMP reaction buffer หรือการใช้สีฟลูออเรสต์เซนต์ (Fluorescent dye)

วิธี RT-LAMP ได้นำมาพัฒนาเป็นเครื่องมือตรวจแบบ POCT: point of care testing สำหรับโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 เนื่องจากการสกัดและการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมสามารถทดสอบเบ็ดเสร็จในหลอดน้ำยาเดียวกัน จึงลดการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการเปิดและหยดสารสกัดจากตัวอย่างลงในหลอดทำปฏิกิยา อ่านผลได้เร็วขึ้นภายในเวลา 1 ชม. อีกทั้งไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาไม่แพง เช่นอ่างน้ำร้อน อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า แต่อาจพบการอ่านสีที่ไม่ชัดเจนได้เมื่อมีไวรัสปริมาณน้อยๆ

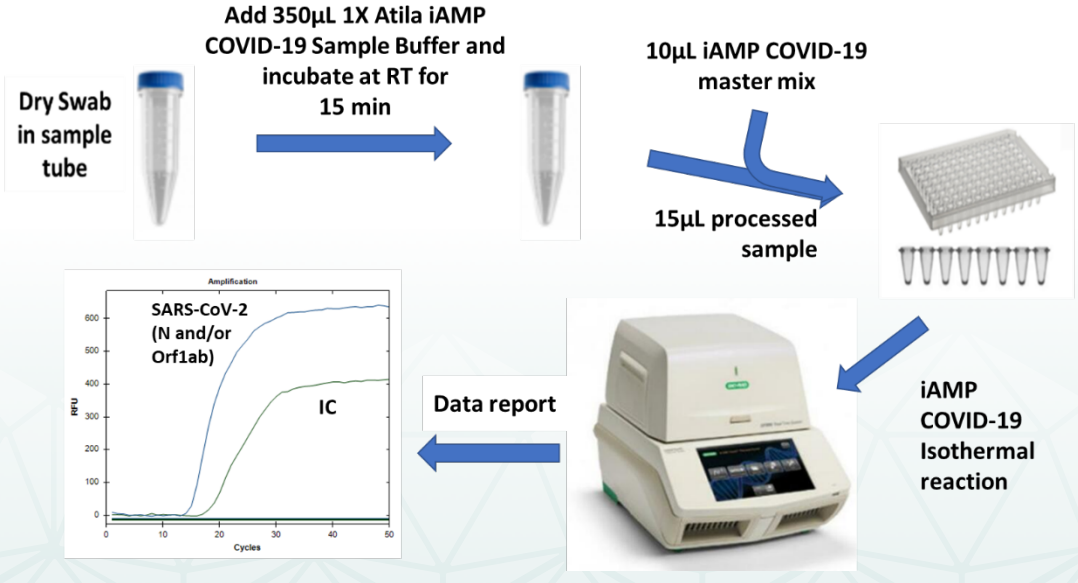


รูปที่ 4 แสดงหลักการและขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

ที่มา: ACS Cent. Sci. 2020, 6, 5, 591-605

บริษัท Abbott Diagnostics Scarborough, Inc ผลิตชุดน้ำยาพร้อมเครื่องมือชื่อ ID NOW COVID-19 โดยใช้หลักการ RT-LAMP รวบขั้นตอนการสกัดและเพิ่มปริมาณ viral RNA target ไว้ในเครื่องมือชิ้นเดียวกัน ลดการปนเปื้อน มีความสะดวกในการอ่านผลเนื่องจากเครื่องจะวิเคราะห์ความเข้มของสี Fluorescent และแปลงเป็นค่า ผลบวก หรือผลลบ จึงใช้เวลาทดสอบรวดเร็วประมาณ 15 นาที ตัวอย่างที่ใช้เป็น dry swab เก็บจาก nasal, throat และ nasopharyngeal จึงยังมีข้อจำกัดที่ตัวอย่างไม่สามารถเก็บใน UTM หรือ VTM จำเป็นต้องนำมาทดสอบโดยเร็ว และทดสอบได้เพียง 1 ตัวอย่างต่อรอบ เป็นระบบปิดที่ต้องใช้น้ำยาและเครื่องมือจำเพาะ

1.2.2 วิธี real-time fluorescent isothermal assay วิธีนี้จดลิขสิทธิ์ในนาม ของ OMEGA amplification (Patent: WO 2017/205510 A1; publication: The Journal of Molecular Diagnostics, Vol.22, No 3, 419-428, 2020) บริษัท Atila BioSystem, Inc นำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจ iAMP COVID-19 detection kit ใช้หลักการเดียวกับRT-LAMP และประยุกต์ใช้สี Fluorescent มาช่วยในการอ่านผลแทนการอ่านด้วยตาเปล่า เช่นเดียวกับ ID NOW COVID-19 แต่สามารถทดสอบโดยใช้เครื่อง realtime PCR ได้หลากหลายยี่ห้อ เพื่อช่วยทำอุณหภูมิและวัดความเข้มของสี Fluorescent วิเคราะห์ผลบวกหรือลบ จากค่า cutoff ct ทำให้ทดสอบตัวอย่างได้จำนวนมาก รอบละ 96 ตัวอย่าง ใช้เวลาประมาณ 1 ชม. รวดเร็วกว่าวิธี Realtime RT-PCR นอกจากนี้ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง nasal, throat และ nasopharyngeal swabs ใช้น้ำยาเติมลงในหลอดตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิห้องเพียง 15 นาทีโดยไม่ต้องผ่านเครื่องมือสกัดสารพันธุกรรม จึงย่นระยะเวลาการทดสอบให้สั้นลง แต่มีข้อจำกัดที่ตัวอย่างไม่สามารถเก็บใน UTM หรือ VTM จำเป็นต้องนำมาทดสอบภายใน 2 ชม.หากไม่สามารถทำได้ให้เก็บที่ 4 C ภายใน 12 ชม. วิธีนี้มีความไวเชิงวิเคราะห์ หรือ limit of detection (LOD) ประมาณ 60 copies per reaction

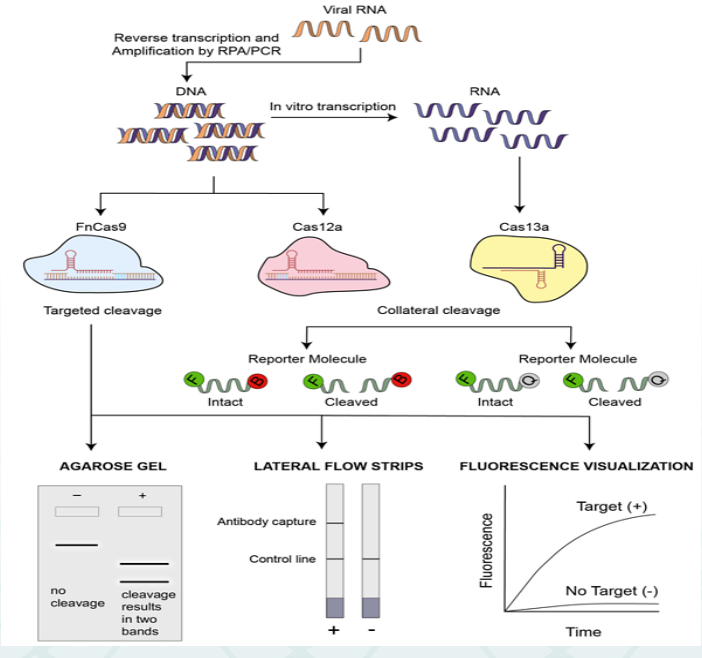


รูปที่ 5 แสดงหลักการและขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี real-time fluorescent isothermal assay
ที่มา: https://atilabiosystems.com/our-products/covid-19/

1.3 วิธี CRISPR-Based Assays

1.3.1 เทคนิค Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR Assay)

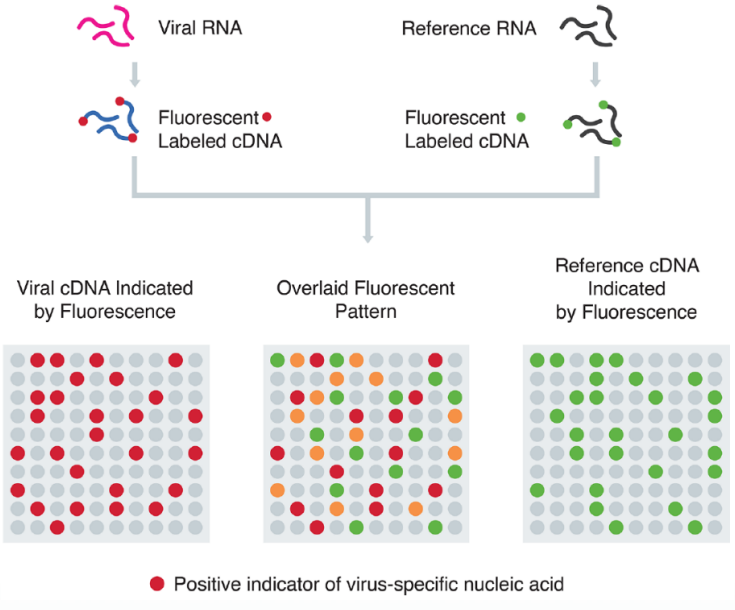
ระบบ CRISPR-Cas เป็นกลไกระบบภูมิคุ้มกันแบบหนึ่งของแบคทีเรีย ลักษณะการทำงานของระบบนี้คล้ายคลึงกับการทำงานของ RNA interference (RNAi) ที่พบได้ในเซลล์สัตว์และพืชชั้นสูง ยีน CRISPR และยีน Cas จะทำงานร่วมกันโดยท้ายสุด โปรตีน Cas ซึ่งมีอยู่หลายชนิดจะเข้าไปจับและทำลาย DNA ของ Phage นักวิทยาศาตร์นำ CRISPR-Cas system มาประยุกต์ใช้สาหรับการแก้ไขหรือเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (gene editing) อย่างกว้างขวางและในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยได้พัฒนามาใช้สำหรับการตรวจหายีนเป้าหมาย (gene detecting) โดยเฉพาะการใช้ เอมไซม์ Cas 12 และ Cas 13 ซึ่งมีคุณสมบัติในการตัดสาย viral RNA ดังนั้นในช่วงที่โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ระบาดใหญ่ บริษัท 2 แห่งในสหรัฐอเมริการจึงได้นำ CRISPR-Cas system มาพัฒนาผลิตเป็นชุดน้ำยาชื่อ CRISPR-based test for SARS-CoV-2 ใช้หลักการ CRISPR-based Sherlock lateral flow assay isothermal amplification ผลิตโดยบริษัท Sherlock Biosciences, USA ใช้โปรตีน Cas 13a ส่วนบริษัท Mammoth Biosciences, USA ใช้โปรตีน Cas 12a ผลิตชุดน้ำยาชื่อ SARS-CoV-2 DETECTR หลักการ CRISPR-based DETECTR lateral flow assay isothermal amplification เทคนิค CRISPR Assay มีข้อดีคือ น้ำยาและเครื่องมือพื้นฐานมีราคาถูก เช่น heat block หรือ water bath มีขั้นตอนการทดสอบง่าย อ่านได้ด้วยตาเปล่าจากแผ่นทดสอบ ใช้เวลา 40-60 นาที มีความไว หรือ LOD ประมาณ 10-100 copies/ul แต่ยังมีข้อจำกัดที่ ตัวอย่างต้องผ่านขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมมาก่อน ในอนาคตอันใกล้ ทั้ง 2 บริษัทกำลังจะพัฒนาชุดตรวจให้เป็นชุดสกัดตัวอย่างในตัวหรือทดสอบในหลอดเดียวกันกับน้ำยา CRISPR-Cas รวมถึงต่อยอดไปสู่ประชาชนให้สามารถตรวจได้เองที่บ้าน หรือ ที่เรียกว่า self test



รูปที่ 6 แสดงหลักการและขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี CRISPR-Based Assays
ที่มา: https://blog.addgene.org/sars-cov-2-covid-19-detection-methods-based-on-crisprcas

1.3.2 เทคนิค Microarray - Nucleic Acid Hybridization

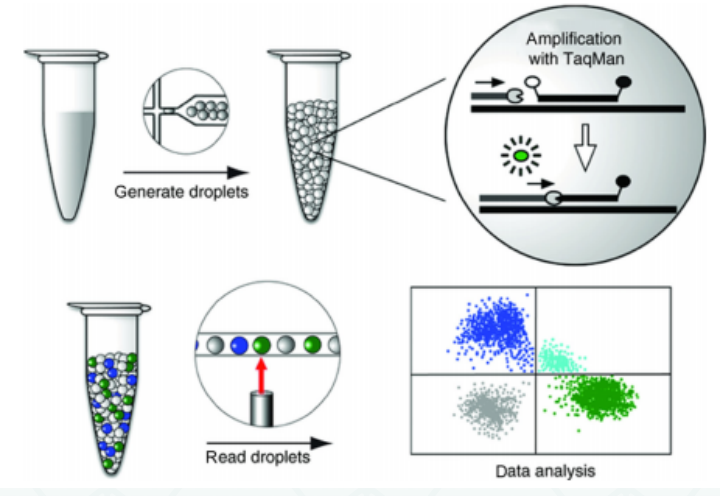
เทคนิคไมโครอาร์เรย์ (microarray) ได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา และถูก นำมาใช้ในการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมอย่างแพร่หลาย อาศัยหลักการไฮบริไดเซชัน (hybridization) ระหว่างดีเอ็นเอ(DNA) กับโพรบ (probe) ที่จำเพาะกับแต่ละตำแหน่งบนโครโมโซมที่นำมาเรียงกันบนวัสดุ เช่น แผ่นสไลด์แก้วหรือแผ่นชิป (chip) เทคนิค Microarray ได้นำพัฒนาต่อโดยมีกระบวนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมหรือ PCR เข้ามาร่วมด้วย เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อโรคชนิดต่างๆรวมทั้ง SARS-CoV-2 ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์เชื้อในกลุ่มโคโรนา หรือแม้แต่การหา single nucleotide polymorphisms (SNP) ของเชื้อ SARS-CoV-2 ได้ ปัจจุบันเทคนิค Microarray มีเครื่องอ่านปฏิกิริยา(Micro analyzer platform) หลายแบบสำหรับ slides , biochip และ 96 well plate ความไว ความจำเพาะเทียบเท่าวิธี realtime RT-PCR ตัวอย่างที่ใช้ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมมาก่อน หลังจากนั้นจะ ใช้เวลา 2-3 ชม.ในการทำปฏิกิริยาและอ่านผล



รูปที่ 7 แสดงหลักการและขั้นตอนการทดสอบด้วยเทคนิค Microarray
ที่มา: ACS Cent. Sci. 2020, 6, 5, 591-605

1.3.3 เทคนิค Droplet Digital PCR (ddPCR)

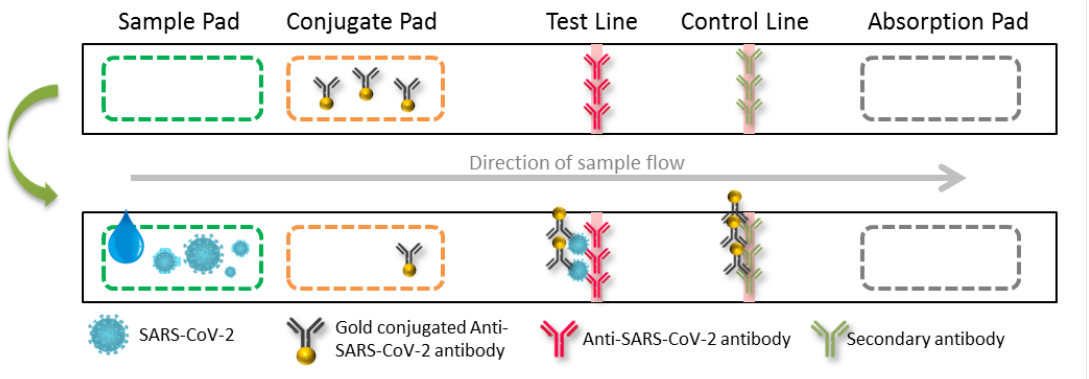
เทคนิคนี้คล้ายคลึงกับวิธี quantitative real-time PCR (qPCR) เป็นการวัด absolute quantification ของยีนที่ต้องการหา เช่น ยีนของเชื้อ SARS-CoV-2 แต่มีข้อดีกว่า qPCR ที่ไม่จำเป็นต้องสร้าง กราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อแปลงผลการวัดเป็นจำนวน DNA copies โดย ddPCR จะวัดปริมาณของผลผลิตที่จุดสุดท้ายของปฏิกิริยา (end point detection) ส่วน reatime PCR จะวัดปริมาณของผลผลิตระหว่างทางของปฏิกิริยาหรือที่ทุกรอบของปฏิกิริยา นอกจากนี้ ddPCR ยังมีความไวสูงกว่าวิธี real-time PCR โดยมีค่า LoD ประมาณ 1-5 copies/reaction เนื่องจากเครื่องทำปฏิกิริยาสามารถแบ่ง partiton ของปฏิกิริยา PCR ให้เป็น droplet ขนาดระดับนาโนลิตรจำนวน 15,000 - 20,000 ปฏิกิริยาซึ่งแต่ละ droplet จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเครื่อง Thermal Cycler PCR และนำไปอ่านค่าการเรืองแสงจาก droplet โดย droplet ใดที่ตรวจพบสี จะเป็น positive droplet ซึ่งอาจมีสีแตกต่างกันไปตามชนิดของสีที่ใช้ติด probes เช่น Evagreen, FAM, HEX และ VIC เป็นต้น สัดส่วนของ positive droplet และ negative droplet จะนำมาวิเคราะห์ผล ด้วย Binomial Probability และ Poisson Approximation ได้ผลสุดท้ายเป็นจำนวน copy ของสารพันธุกรรมที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่าง เครื่องมือและชุดน้ำยาที่ตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค ddPCR ที่ออกจำหน่ายได้แก่ SARS-CoV-2 Droplet Digital PCR (ddPCR) Kit, Bio-Rad Laboratories, 3-COLOR CRYSTAL DIGITAL PCR™ KIT FOR DETECTION OF COVID-19, Stilla Technologies และ FastPlex Triplex SARS-CoV-2 Detection Kit, PreciGenome, LLC เป็นต้น



รูปที่ 8 แสดงหลักการและขั้นตอนการทดสอบด้วยเทคนิค Droplet Digital PCR (ddPCR)
ที่มา: Methods in Microbiology, Volume 42, ISSN 0580-9517

2. การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อโคโรนาไวรัส 2019 (SARS-CoV-2)

การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อโคโรนาไวรัส 2019 (SARS-CoV-2) โดยหลักการถือว่าเป็นวิธีที่ตอบสนองต่อวัตถุประสงค์สำหรับการตรวจคัดกรองหรือการเฝ้าระวังในกลุ่มคนจำนวนมากที่มีความเสี่ยงสูงหรือมีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว และจำเป็นต้องแยกผู้ติดเชื้อให้ได้เร็วที่สุด อีกทั้งมีข้อจำกัดในการตรวจด้วยวิธี PCR การตรวจหาแอนติเจนสามารถให้ผลตรวจที่รวดเร็ว โดยเฉพาะชุดตรวจแบบรวดเร็ว antigen rapid test เป็นแผ่นทดสอบที่หยดตัวอย่างลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส น้ำยาและแอนติบอดีที่ติดฉลากบนกระดาษจะจับโปรตีนของไวรัสที่มีอยู่ในตัวอย่างผู้ป่วยอย่างจำเพาะ สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าภายใน 15 นาที อย่างไรก็ดี ชุดตรวจแบบ rapid test ปัจจุบันยังมีความไว ความจำเพาะที่ต่ำอยู่เริ่มตั้งแต่ร้อยละ 35-80 บางบริษัทพัฒนาให้มีความไวเพิ่มขึ้นโดยการเพิ่มเครื่องอ่านสีขนาดเล็ก วัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้หลักการ immunofluorescence–based lateral flow technology ทำให้ความไวในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ SARS-CoV-2 เพิ่มขึ้น เช่น Sofia SARS Antigen FIA, QUIDEL นอกจากนี้ยังมี SARS-CoV-2 Antigen Detection Kits จากบริษัท Sino Biological US Inc. ซึ่งเป็นบริษัทแรกในโลกที่เริ่มพัฒนาชุดน้ำยาที่ใช้หลักการ sandwich ELISA



รูปที่ 9 แสดงหลักการและขั้นตอนการทดสอบด้วย antigen rapid test
ที่มา: https://www.acebiolab.com/TW/news/44

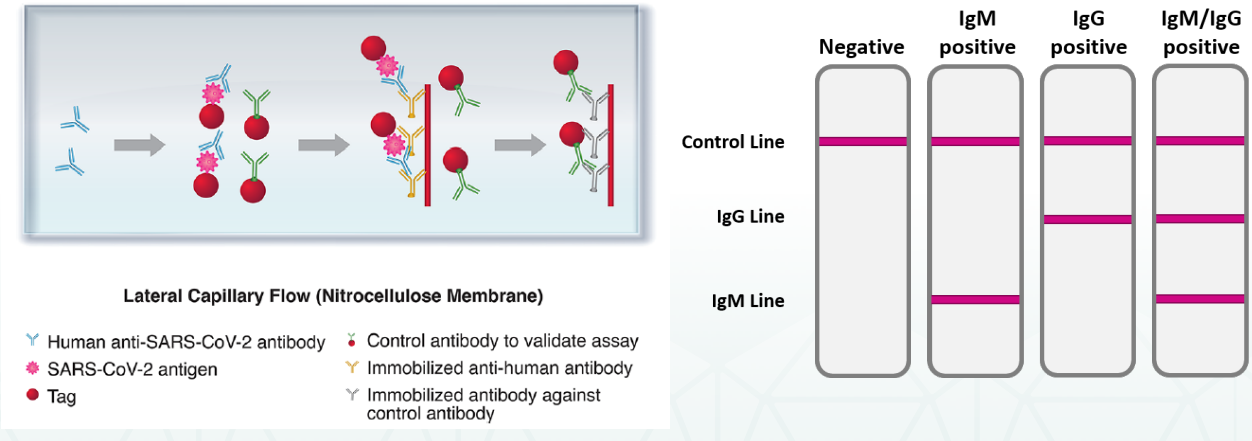
3. การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARS-CoV-2)

โดยทั่วไปภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อจะเพิ่มขึ้นจนตรวจวัดได้หลังจากผู้ป่วยมีอาการแล้วนาน 5-7 วันหรือนานกว่านั้น แต่สำหรับเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นเชื้ออุบัติใหม่ข้อมูลการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ไม่ว่าจะเป็นชนิด IgA, IgG และ IgM ระยะเวลาที่ระดับแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นหลังผู้ป่วยติดเชื้อ ยังมีข้อมูลอยู่อย่างจำกัด และอาจมีการตอบสนองที่แตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย การตรวจหาแอนติบอดี หรือภูมิคุ้มกัน จึงเสี่ยงต่อการวินิจฉัยโรคผิดได้ หากอ่านผลเป็นลบ ไม่อาจสรุปได้ว่าผู้นั้นไม่ติดเชื้อโควิด ข้อมูลเท่าที่มีอยู่ในขณะนี้คือ ผู้ป่วยส่วนใหญ่เริ่มมีภูมิคุ้มกันที่ตรวจวัดได้ตั้งแต่ 10-21 วันนับจากวันที่แสดงอาการ ในผู้ป่วยที่มีอาการเล็กน้อย (mild cases) อาจตรวจพบได้หลังจากมีอาการ 3 สัปดาห์ อย่างไรก็ดีการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการสอบสวนโรค กรณีกลุ่มคนที่ใกล้ชิดกับผู้ป่วยแต่ไม่แสดงอาการหรือมีอาการแต่มาพบแพทย์ล่าช้าเมื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อแล้วไม่พบ หรือนำไปใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของโรคโดยการสำรวจภูมิคุ้มกันในประชากร การตรวจหาภูมิคุ้มกันมีหลายวิธี เช่น

3.1 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Immunoassay

หลักการ Immunoassay คือการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อกันเกิดเป็น antigen-antibody complex การวัดระดับของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและภูมิคุ้มกันที่ต้องการศึกษา สามารถใช้สารเคมีหรือเอมไซม์เข้ามาจับ antigen-antibody complex อีกชั้นหนึ่งเพื่อให้เกิดเป็นผลผลิตที่สามารถวัดได้ เช่น รังสี สีของสารเคมี สีฟลูออเรสเซนต์ และแสง ซึ่งการทดสอบอาจเกิดบนหลุมปฏิกิริยา (microplate) หรือบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แอนติเจนที่บริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบใช้มีหลากหลายรูปแบบ อาจเป็น recombinant protein หรือ synthetic peptide ของเชื้อ SARS-CoV-2 เช่น Spike (S) antigens: spike trimeric ectodomain (Stri), ireceptor-binding domain (RBD), spike subunit 1 (S1), spike subunit 2 (S2) และ nucleocapsid (N) เป็นต้น

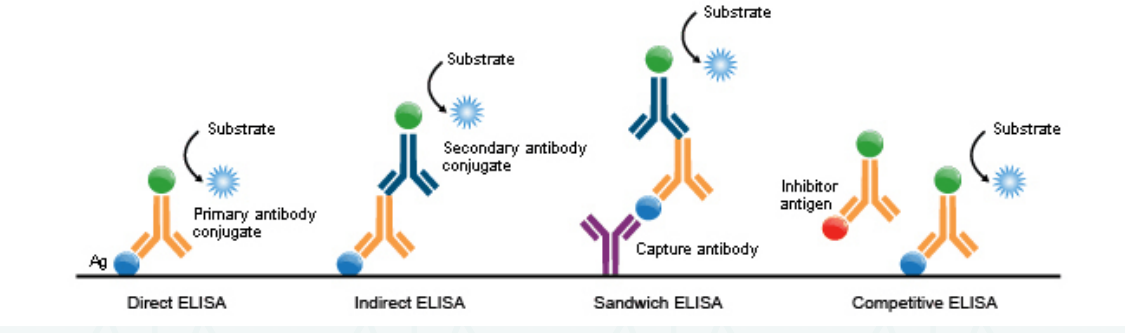
3.1.1 **ชุดตรวจแบบรวดเร็ว หรือ antibody rapid test** ส่วนใหญ่ใช้หลักการ lateral flow immunoassay มีความไว ความจำเพาะที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับชนิดและคุณภาพของแอนติเจน ที่ตรึงอยู่บนแผ่นกระดาษทดสอบเมื่อหยดตัวอย่างเลือดลงบริเวณ sample pad ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยที่จำเพาะจะซึมผ่านแผ่นกระดาษจับกับแอนติเจนที่ติดฉลาก (enzyme/gold nanoparticle-conjugated antigen) บริเวณ conjugation pad เกิดเป็น antigen-antibody complex จากนั้นจึงซึมผ่านแผ่นกระดาษเข้าจับ anti-human IgM ที่ IgM line และ anti-human IgG ที่ IgG line เฉพาะ human IgM/IgG antibody/SARS-CoV-2 antigen-gold nanoparticle complex เท่านั้นที่จะทำให้เกิดสี ส่วนบริเวณ control line ตัวอย่างที่มีหรือไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 จะให้สีทั้งคู่ซึ่งเกิดจาก Anti rabbit antibody/rabbit IgG-gold nanoparticle complex ใช้สำหรับตรวจสอบคุณภาพขององค์ประกอบใน cassette antibody rapid test สามารถอ่านผลได้ภายใน 15 นาที อย่างไรก็ตามการทดสอบและแปลผลควรดำเนินการโดยบุคลากรทางการแพทย์เท่านั้น



รูปที่ 10 แสดงหลักการและขั้นตอนการทดสอบด้วย antibody rapid test
ที่มา: https://www.cebm.net/wp-content/uploads/2020/04CurrentCOVIDTests_descriptions-FINAL.pdf

3.1.2 เทคนิค Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) , Chemiluminescence immunoassay (CLIA) และ Fluoroimmunoassay (FIA) ทั้ง 3 เทคนิคใช้หลักการคล้ายคลึงกัน ต่างกันตรงที่สารใช้ติดฉลาก (lebeling) และสับเตรด (substrate) ที่ทำให้เกิดสัญญาณ (signal) ในการวัดผลที่ต่างกัน เช่น สี (Color change) สีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence) และ แสง (Visible light) เป็นต้น เทคนิคดังกล่าวสามารถบอกระดับหรือปริมาณแอนติบอดีได้ทั้งชนิด IgA, IgG และ IgM จึงมีประโยชน์ในการหา seroconversion ในผู้ที่ได้รับวัคซีน หรือ การวิจัยเพื่อติดตามการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อโรคนอกจากนี้ยังมีเครื่องแบบ fully automate สามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละ 96 ตัวอย่างในหลุม microplate เช่น SARS-CoV-2 IgG assay - Abbott Laboratories Inc. chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA)

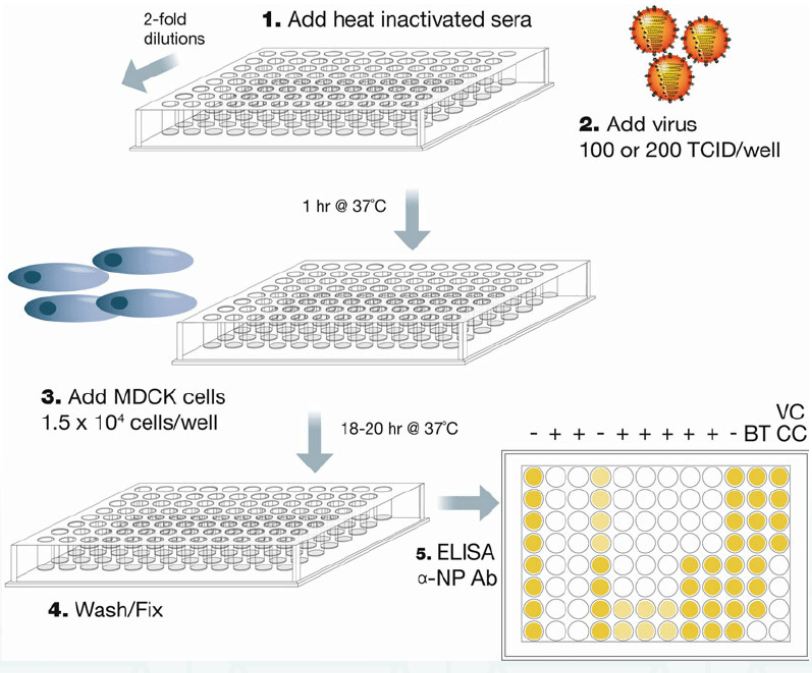
Techniques	Labeling	Substrate	Signal	Sensitivity
ELISAbv	Enzymes (HRP,AP)	Chromogen substrate	Color change	high
FIA	Fluorogenic Reporters (Rhodamine)	None	Fluorescence	high
CLIA	Chemical probes (Acridinium Ester, luminol)	luminescence substrate	Visible light	Ultrahigh



รูปที่ 11 แสดงหลักการ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
ที่มา: http://www.antibodycenter.co.kr/bbs/board.php?bo_table=goods&wr_id=9&page=21

3.2 การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Antibody Neutralizing Assay

วิธีนี้ถือเป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากเป็นการตรวจภูมิคุ้มกันแบบรวมชนิด (total antibody) ที่มีคุณสมบัติใน การยับยั้งการเข้าเซลล์ของไวรัส จึงจำเป็นต้องใช้เชื้อเป็น และห้องปฏิบัติงานในชีวนิรภัยระดับ 3 (BSL-3) ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่ซับซ้อนและต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการเพาะเลี้ยงเซลล์และไวรัส ใช้เวลานาน 5-7 วัน แต่เป็นวิธีที่เหมาะสมและถือเป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน เนื่องจากสามารถบ่งชี้ว่าผู้รับวัคซีนมีภูมิคุ้มกันป้องกันการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ได้หรือไม่ ? แต่อย่างไรก็ดี ขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลว่าระดับ NT titer เท่าใดที่จะสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ ในบางห้องปฏิบัติการได้พัฒนาวิธีนี้ให้สามารถทดสอบได้ในห้อง BSL-2 enhanced ได้โดยใช้ Surrogate virus หรือ Virus like particle ที่มีโปรตีนส่วนสำคัญของ SARS-CoV-2 เช่น receptor binding site (RBD) หรือ receptor ACE2 ของผิวเซลล์ ทำให้ไวรัสที่เตรียมขึ้นใหม่นี้ขาดคุณสมบัติในการติดเชื้อหรือก่อโรคในคน การตรวจหา Neutralizing antibody มีหลายเทคนิค เช่น Plaque reduction neutralization test (PRNT) วัดผลโดยนับจำนวน plaque ที่ลดลงจากการยับยั้งของภูมิคุ้มกันจากนั้นจึงคำนวณหาระดับ NT titer วิธี Serum virus neutralization (SVN) assay และวิธี Micro NT เป็นการประยุกต์นำเอาวิธี PRNT รวมกับวิธี ELISA/IFA ทำให้การอ่านผลง่ายขึ้นในกรณีที่ ไวรัสทำให้เกิด plaque ในเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ชัดเจน



รูปที่ 12 แสดงขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Antibody Neutralizing Assay
ที่มา: Manual of Micro-NT for avian influenza, US-CDC

ตารางที่ 1 การจำแนกวิธีตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการตรวจ	ประเภทการใช้งาน	เครื่องมือ	จำนวนตัวอย่าง/ระยะเวลาการตรวจต่อรอบ
1. การตรวจหาสารพันธุกรรม (Molecular techniques)			
1.1 realtime RT-PCR	-Laboratory based (BSL-2 enhanced) - POCT	- realtime PCR / fully automate - realtime PCR (POCT)	96-384 ตัวอย่าง 2 - 3 ชั่วโมง 1 - 10 ตัวอย่าง 1 ชั่วโมง
1.2 Isothermal Nucleic Acid Amplification (RT-LAMP)	- POCT	- water bath/PCR	30 ตัวอย่าง 30 นาที
1.3 real-time fluorescent isothermal assay (realtime RT-LAMP)	-Laboratory based (BSL-2 enhanced)	- realtime PCR	96 ตัวอย่าง 1 ชั่วโมง
1.4 CRISPR Assay (lateral flow strip)	-Laboratory based (BSL-2 enhanced)	- PCR	1– 96 ตัวอย่าง 1 - 3 ชั่วโมง
1.5 Microarray - Nucleic Acid Hybridization	-Laboratory based (BSL-2 enhanced)	-Micro analyzer platform	2 - 3 ชั่วโมง
1.6 Droplet Digital PCR (ddPCR)	-Laboratory based (BSL-2 enhanced)	-Droplet Digital PCR	96 ตัวอย่าง 5 - 6 ชั่วโมง
2. การตรวจหาแอนติเจน (Antigen detection)			
2.1 antigen rapid test	- POCT	-	15 – 20 นาที
2.2 immunofluorescence –based lateral flow	- POCT	เครื่องอ่านสีบน strip test	15 – 20 นาที
2.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	-Laboratory based (BSL-2 enhanced)	เครื่องอ่าน ELISA	96 ตัวอย่าง 2 - 5 ชั่วโมง
3. การตรวจหาแอนติบอดี (Antibody detection)			
3.1 antibody rapid test (lateral flow immunoassay)	- POCT	-	15 – 30 นาที
3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	-Laboratory based (BSL-2 enhanced)	เครื่องอ่าน ELISA/Fully automate	96 ตัวอย่าง 2 - 5 ชั่วโมง
3.3 Chemiluminescence immunoassay (CLIA)	-Laboratory based (BSL-2 enhanced)	เครื่องอ่าน CLIA/Fully automate	96 ตัวอย่าง 1 - 3 ชั่วโมง
3.4 Fluoroimmunoassay (FIA)	-Laboratory based (BSL-2 enhanced)	เครื่องอ่าน FIA/Fully automate	96 ตัวอย่าง 1 - 3 ชั่วโมง
3.5 Antibody Neutralizing Assay	-Laboratory based (BSL-2 enhanced) -Laboratory based (BSL-3)	-Biosafety cabinet -Inverted microscope -CO_2 incubator	5-7 วัน

บทสรุป

จากเทคนิคที่หลากหลายในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทางห้องปฏิบัติการ การตรวจหาสารพันธุกรรม (Molecular techniques) ยังคงเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อการรักษาที่รวดเร็ว และแม่นยำ ปัจจุบันชุดน้ำยาที่ตรวจหาสารพันธุกรรมส่วนใหญ่ได้พัฒนาให้มีความไว และความจำเพาะสูงในระดับที่ใกล้เคียงกัน มีบางเทคนิคที่มีความไวสูงกว่าวิธี PCR ทั่วไปและสามารถตรวจหาจำนวน copies ของไวรัสได้อย่างแม่นยำ เช่น Droplet Digital PCR ดังนั้นความได้เปรียบของเทคนิคเหล่านี้ จึงขึ้นอยู่กับการลดขั้นตอนในการสกัดตัวอย่าง วิธีการตรวจมีความสะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ น้ำยาและเครื่องมือมีราคาถูก เช่น เครื่องตรวจวิเคราะห์ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (POCT : Point of Care Testing) ซึ่งปัจจุบัน POCT ได้พัฒนาให้สามารตรวจเชื้อได้หลายชนิดพร้อมกัน (Multiplexed point-of-care testing) แต่ POCT ยังมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถตรวจตัวอย่างต่อรอบได้จำนวนมาก เครื่องมือแบบ high through put หรือ Fully automate จึงเหมาะกับการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก บางบริษัทพัฒนาให้ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างและการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทำได้ในหลอดเดียวกัน หรือที่เรียกว่า DIRECT-PCR จึงย่นเวลาการตรวจตัวอย่างจำนวนมากให้สั้นลง แต่ยังจำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการ BSL-2 enhanced นอกจากนี้บางเทคนิคสามารถตอบโจทย์ได้มากกว่าการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 เช่น การหายีนกลายพันธุ์ ที่เกิดจาก single nucleotide polymorphisms (SNP) หรือการจำแนกสายพันธุ์ของ SARS-CoV-2 เช่นวิธี Microarray - Nucleic Acid Hybridization และ Droplet Digital PCR เป็นต้น อย่างไรก็ดี เทคนิคการตรวจหาสารพันธุกรรม แม้จะมีความไวสูง แต่อาจเกิดผลลบปลอม (false negative) ได้หากการเก็บตัวอย่างไม่ถูกวิธี ถูกตำแหน่ง และในระยะเวลาที่เหมาะสม เป็นต้น

ส่วนการตรวจหาภูมิคุ้มกันไม่เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อการรักษา แต่ยังคงมีประโยชน์ ในการสอบสวนโรค กรณีกลุ่มคนที่ใกล้ชิดกับผู้ป่วยแต่ไม่แสดงอาการหรือมีอาการแต่มาพบแพทย์ล่าช้าเมื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อแล้วไม่พบ การศึกษาระบาดวิทยาของโรคโดยการสำรวจภูมิคุ้มกันในประชากร และการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน เป็นต้น อย่างไรก็ดีประเด็นการเลือกใช้ antibody rapid test ยังคงมีข้อควรระวัง เนื่องจากชุดน้ำยาบางยี่ห้อเมื่อนำมาใช้งานแล้วพบว่ามีความไว ความจำเพาะต่ำกว่าที่บริษัทระบุไว้ในเอกสารกำกับชุดน้ำยา ทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะเร่งด่วนที่มีการระบาดใหญ่ทั่วโลก ในบางประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา US FDA ได้กำหนดเกณฑ์การขึ้นทะเบียนชุดน้ำยาไม่ว่าจะเป็นด้าน Molecular techniques , Antigen detection และ Antibody detection สำหรับใช้ในสภาวะเร่งด่วน หรือ Emergency used authorization (EUA) ด้วยการประเมินเอกสารด้านเทคนิคตามข้อกำหนดของ US FDA เท่านั้น

การตัดสินใจเลือกใช้เทคนิคใด เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งาน เช่น เพื่อการรักษา การเฝ้าระวังโรค การสอบสวนโรค การศึกษาระบาดวิทยา งานวิจัย ซึ่งต้องพิจารณาร่วมกับการประเมินความพร้อมด้านทรัพยากรต่างๆ เช่น งบประมาณ ศักยภาพของห้องปฏิบัติการ ความเชี่ยวชาญและกำลังของบุคลากร และอาจปรับการใช้เทคโนโลยีแบบผสมผสานตามสถานการณ์การระบาดของโรคและทรัพยากรที่มีอยู่ในขณะนั้น เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ส่วนการเลือกบริษัทหรือยี่ห้อของชุดน้ำยา นอกจากจะพิจารณาจากการขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายในประเทศแล้วพิจารณาความไว ความจำเพาะที่ระบุไว้ในเอกสารกำกับชุดน้ำยา หากมีผลการประเมินจากห้องปฏิบัติการอ้างอิงในประเทศ จะช่วยให้ชุดน้ำยานั้นมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น และผู้ใช้ควรประเมินความใช้ได้ของชุดน้ำยาที่เลือกโดยอาจส่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบจำนวนหนึ่งไปตรวจยืนยันยังห้องปฏิบัติการอ้างอิง หรือเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญฯ หรือการขอตัวอย่างอ้างอิงมาทดสอบกับชุดน้ำยา เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Basu A, Zinger T, Inglima K, Woo K, Atie O, Yurasits L, et al. Performance of Abbott ID NOW COVID-19 rapid nucleic acid amplification test in nasopharyngeal swabs transported in viral media and dry nasal swabs, in a New York City academic institution. J Clin Microbiol [online]. 2020; [cited 2020 Jun 17]; [19 screens]. Available from: URL: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.11.089896v2.full.pdf.
2. COVID-19 drives CRISPR diagnostics. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 17]; [5 screens]. Available from: URL: https://www.genengnews.com/insights/covid-19-drives-crispr-diagnostics.
3. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. ACS Cent Sci 2020; 6(5): 591-605.
4. iAMP® COVID-19 detection kit. (for research use only; not for use in diagnostic procedure). Mountain View, CA: ATILA BioSystems; 2020.
5. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art. Emerg Microbes Infect. 2020; 9(1): 747-56.
6. Mitchell SL, St. George K, Rhoads DD, Butler-Wu SM, Dharmarha V, McNult P, et al. Understanding, verifying and implementing Emergency Use Authorization molecular diagnostics for the detection of SARS-CoV-2 RNA. J Clin Microbiol [online]. 2020; [cited 2020 Jun 17]; [20 screens]. Available from: URL: https://jcm.asm.org/content/jcm/early/2020/05/07/JCM.00796-20.full.pdf.
7. Sofia 2 SARS antigen FIA: objective SARS-CoV-2 results at your fingertips. [online]. 2020;[cited 2020 Jun 17]; [2 screens]. Available from: URL: https://www.cardinalhealth.com/content/dam/corp/web/documents/brochure/cardinal-health-quidel-sofia-2-sars-antigen-fia-brochure.pdf.
8. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. J Clin Microbiol 2020; 58(6): e00512-20. (9 pages).
9. White RA, de Cardenas JNB , Hayden RT. Chapter 16 - Virology: the next generation from digital PCR to single virion genomics. Methods in Microbiology 2015; 42: 555-67.
10. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): current status, challenges, and countermeasures. Rev Med Virol 2020; 30(3): e2106.(14 pages).

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
88/7 ซอยสถาบันบำราศนราดูร ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี
โทรศัพท์ 0 2951 0000, 0 2589 9850
www.dmsc.moph.go.th