

ข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในการชันสูตรเกี่ยวกับโรค SARS

1. ปัจจุบันการวินิจฉัยโรค SARS ยังคงใช้อาการและประวัติการเดินทางของผู้ป่วยเป็นข้อบ่งชี้โรค เนื่องจากเป็นวิธีเดียวที่จะคัดผู้ป่วยออกมาจากคนปกติได้เร็วที่สุดเพื่อป้องกันการระบาดของโรค ส่วนการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อพิสูจน์เชื้อที่เป็นสาเหตุยังไม่สามารถรับรองประสิทธิภาพได้ว่า จะตรวจพบเชื้อได้ทุกราย
2. อย่างไรก็ตามการดูแลลักษณะอาการของโรคอย่างเดียวไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นการติดเชื้ออะไร ถึงแม้ว่าองค์การอนามัยโลกได้ประกาศว่าเชื้อ Coronavirus ชนิดใหม่ เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงของโรค แต่ยังไม่มียารักษาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค SARS ทั่วโลกทุกรายจะมีเชื้อ Coronavirus เพราะยังไม่มีการตรวจพิสูจน์ทางห้องปฏิบัติการทุกราย และมีความเป็นไปได้ว่าผู้ป่วย SARS บางรายอาจจะเกิดจากการติดเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ใช่ Coronavirus หรือมีการติดเชื้อหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งการตรวจทางห้องปฏิบัติการเท่านั้นจะตอบข้อสงสัยนี้ได้
3. ดังนั้นการตรวจทดสอบทางห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบ Coronavirus ก็ไม่ได้หมายความว่าผู้ป่วย จะไม่มีเชื้ออื่นที่สามารถทำให้เกิดโรค SARS ได้ ยังจำเป็นต้องกักตัวผู้ป่วยไว้ระยะหนึ่งเช่นกัน
4. เชื้อ Coronavirus ที่พบในผู้ป่วยโรค SARS เป็น Coronavirus ชนิดใหม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจาก Coronavirus ที่มีรายงานในระบบ bioinformatic เช่น GENBANK อย่างชัดเจน การจะพัฒนายาทดสอบเชื้อนี้ให้มีความจำเพาะสูงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลจำเพาะของเชื้อ Coronavirus ชนิดใหม่ให้ใกล้เคียงที่สุด
5. การตรวจทดสอบเชื้อ Coronavirus เนื่องจากเชื้อ Coronavirus ที่พบเป็นชนิดใหม่จึงยังไม่มีชุดยาคูทดสอบที่ใช้ทั่วไป ดังนั้นห้องปฏิบัติการในเครือข่ายองค์การอนามัยโลกได้พัฒนาวิธีการทดสอบ จากข้อมูลของไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยโรค คือ
 - 5.1 การตรวจหาแอนติบอดีต่อ Coronavirus มี 2 วิธี คือ Immunofluorescence assay (IFA) และ enzyme immunoassay (EIA) เป็นการตรวจในซีรัมหรือพลาสมาที่เก็บห่างกัน 2-3 สัปดาห์ เพื่อดูว่ามีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นกว่า 4 เท่าหรือไม่ การเตรียมยาคูทดสอบต้องแยกเชื้อไวรัสจากผู้ป่วยให้ได้ก่อนจึงจะนำมาเตรียมแอนติเจนสำหรับทดสอบกับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย วิธีนี้ใช้เวลาทดสอบประมาณ 5-6 ชั่วโมง สามารถทำในห้องปฏิบัติการระดับ 1 ได้ แต่จะตรวจพบการติดเชื้อได้เมื่อผู้ป่วยมีอาการมาแล้ว 21 วัน จึงไม่ใช่วิธีที่ตรวจเร่งด่วน
 - 5.2 การตรวจแยกเชื้อไวรัส จากตัวอย่าง Throat swab หรือ nasopharyngeal swab โดยการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เลี้ยง (cell culture) แล้วสังเกตดู cytopathogenic effect (CPE) ของเซลล์ แล้วพิสูจน์เชื้อ Coronavirus ด้วย Immunofluorescence assay (IFA) ใช้

เวลาทดสอบนานประมาณ 2 สัปดาห์ มีวิธีการยุ่งยาก ต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 3 เท่านั้น และจะตรวจพบได้เมื่อผู้ป่วยมีอาการแล้ว 3-5 วันขึ้นไป

5.3 การตรวจหาสารพันธุกรรมของ Coronavirus ในตัวอย่างจาก throat swab หรือ nasopharyngeal swab หรือจากเซลล์ที่เลี้ยงแยกเชื้อไวรัสในข้อ 5.2

มีหน่วยงานในเครือข่ายของ WHO 2 แห่งที่พัฒนาวิธีการนี้ขึ้นมาและแจ้งวิธีการให้ห้องปฏิบัติการทั่วโลกนำไปใช้เป็นกรณีเร่งด่วน คือ US CDC สหรัฐอเมริกา และ Bernhard-Nocht Institute (BNI) of Tropical Medicine, Hamburg ประเทศเยอรมันนี้ ทั้งสองแห่งใช้หลักการของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสที่เรียกว่า

5.3.1 RT-PCR มาจากคำว่า Reverse transcription (RT) และ polymerase chain reaction (PCR) ในการทดสอบจำเป็นต้องใช้ primer (เส้น DNA เส้นสั้นๆ ที่มีลำดับพันธุกรรมเหมือนกัน coronavirus และสามารถสังเคราะห์โดยใช้เครื่องมือพิเศษได้) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสนี้ ทั้ง US CDC และ BNI ได้ออกแบบลำดับพันธุกรรมของ primer ส่งมาให้กรมวิทย์ฯ และศิริราชพยาบาลแล้ว โดยใช้ข้อมูลจากยีนของไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย ทางกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้สั่งสังเคราะห์จากบริษัทในประเทศไทยได้

ขั้นตอนของวิธี RT-PCR

- การสกัดเอาไวรัสที่เป็น RNA จากตัวอย่างผู้ป่วยโดยใช้เครื่องมือและสารเคมีสกัด (ต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 3 หรือ 2 เท่านั้น) ใช้เวลานาน 1-2 ชั่วโมง (ถ้าหากใช้เครื่องมืออัตโนมัติจะใช้เวลาประมาณ 15 นาที)
- การนำเอา RNA ของไวรัสมาเปลี่ยนเป็น DNA ด้วยปฏิกิริยา revers transcription (ต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 2 และพื้นที่สะอาดเท่านั้น) ใช้เวลานาน 1-2 ชั่วโมง
- การนำเอา DNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนให้เกิดการเพิ่มจำนวนเฉพาะ DNA ของไวรัสเท่านั้น การทำงานจะเป็นลักษณะของ cycle จำนวน ~40 cycles แต่ละ cycle จะมีการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสเป็นทวีคูณ จนเป็นจำนวนมากพอที่จะสามารถตรวจพบได้ ขั้นตอนนี้จะต้องใช้เครื่องมือ PCR machine (ทำในห้องปฏิบัติการระดับ 2 หรือ 1) ใช้เวลานาน 3-4 ชั่วโมง

- หลังจากนั้นจะต้องตรวจว่ามี DNA เพิ่มขึ้นหรือไม่โดยการทำ gel electrophoresis โดยให้ DNA วิ่งในกระแสไฟฟ้าคู่กับ DNA marker เพื่อดูขนาดของ DNA ที่ได้ว่าตรงกับขนาด DNA ของไวรัสหรือไม่ (ต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 2 หรือ 1) ใช้เวลานาน 45 นาที
รวมเวลาการทดสอบประมาณ 6 ชั่วโมง

5.3.2 การทดสอบวิธี Real-time PCR ทางสถาบัน BNI เยอรมันนี้ ได้พัฒนาวิธีนี้ขึ้นเพื่อให้สามารถตรวจ Coronavirus ที่ปริมาณต่างๆ ได้ โดยประกอบด้วยหลักการ ดังนี้

ขั้นตอนของวิธีการ

- การสกัดเอาไวรัสที่เป็น RNA จากตัวอย่างผู้ป่วยโดยใช้เครื่องมือและสารเคมีสกัด (ต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 3 หรือ 2 เท่านั้น) ใช้เวลานาน 1-2 ชั่วโมง
- เช่นเดียวกับวิธี RT-PCR เป็นขั้นตอนเปลี่ยน RNA ของไวรัสให้เป็น DNA (reverse transcription) และเพิ่มจำนวน DNA ให้มากขึ้น (PCR) โดยผ่านปฏิกิริยาเป็น cycle แต่ทำงานในเครื่องมือพิเศษที่เรียกว่า real time ซึ่งต่างจากวิธี RT-PCR ที่ต้องรอปฏิกิริยาให้ครบ 40 cycles เสียก่อน และตัว primer ที่ใช้จะถึงติดฉลากด้วยสีเรืองแสง เพื่อให้เครื่องมือ real time machine สามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวน DNA ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ทำให้มีความไวในการตรวจพบ DNA ได้สูงกว่า RT-PCR (ต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 2 หรือ 1) ใช้เวลานาน 1-2 ชั่วโมง
รวมเวลาการทดสอบประมาณ 3 ชั่วโมง

5.3.3 การทดสอบวิธี GeneScan RT-PCR เป็นวิธีที่ US CDC พัฒนาให้มีความไวขึ้นแทนวิธี RT-PCR แต่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ คือ Automate DNA

sequencer และโปรแกรมวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์ (GeneScan)

ขั้นตอนของวิธีการ

- การสกัดเอาไวรัสที่เป็น RNA จากตัวอย่างผู้ป่วยโดยใช้เครื่องมือและสารเคมีสกัด (ต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 3 หรือ 2 เท่านั้น) ใช้เวลานาน 1-2 ชั่วโมง
- เพิ่มจำนวน DNA ของไวรัส เหมือนขั้นตอนที่ 2 ของวิธี RT-PCR แต่ primer ที่ใช้จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และทำปฏิกิริยาในเครื่องมือ PCR machine จนครบ 40 cycle (ทำให้ห้องปฏิบัติการระดับ 2 หรือ 1) ใช้เวลานาน 3-4 ชั่วโมง
- หลักจากนั้นจะต้องตรวจว่ามี DNA เพิ่มขึ้นหรือไม่โดยการทำ GeneScan ด้วยเครื่อง Automate DNA sequencer โปรแกรมคอมพิวเตอร์จะตรวจหา DNA fragment เรืองแสงที่ตรงกับขนาด DNA ของไวรัส จึงทำให้มีความไวในการตรวจพบ DNA ได้สูงกว่า RT-PCR เช่นเดียวกับ real time PCR (ต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 2 หรือ 1) ใช้เวลานาน 30 นาที รวมเวลาการทดสอบประมาณ 5 ชั่วโมง

ที่มา : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

<http://www.dmsc.moph.go.th/hotissue/sars.htm>