

ข้อสังเกต

“วิธี Standard และ วิธี Rapid”

Real-time RT-PCR for SARs-CoV-2



แพทย์หญิง รัญยาสิริ จินดา ยก, ทนพญ. รัชชพร ชื่นเกษร

ฝ่ายพยาธิวิทยาคลินิก รพ.มหาวิทยาลัยนเรศวร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (SARs-CoV-2) ปัจจุบันถือว่าการตรวจด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR (Quantitative method) เป็นวิธีมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ หรือ ที่นิยมเรียกกันว่า **“Standard Real-time RT-PCR”**

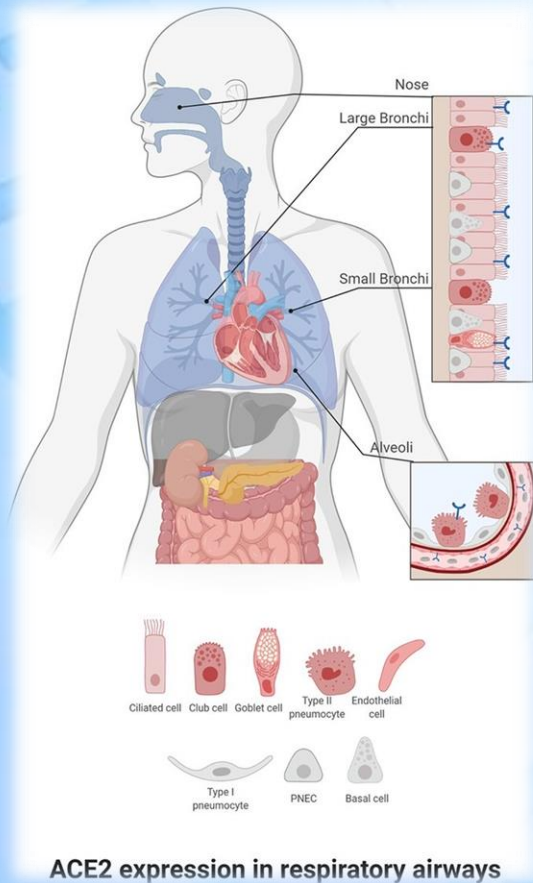
ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดขั้นตอนในกระบวนการทดสอบของ Real time RT-PCR หรือที่นิยมเรียกว่า วิธี **“Rapid Real-time RT-PCR”** หรือ **“POCT Real-time RT-PCR”** เพื่อให้รายงานผลได้รวดเร็วขึ้น โดยยังคงประสิทธิภาพการทดสอบที่สูงเมื่อเทียบกับวิธี Standard Real-time RT-PCR ซึ่งทั้งสองวิธีมีความแตกต่างในด้านต่าง ๆ พอสมควร โดยในบทความนี้ จะขอกล่าวสรุปเฉพาะข้อสังเกต 4 ข้อ ดังนี้



1) ระยะเวลาทดสอบ : วิธี Standard Real-time RT-PCR โดยทั่วไปใช้เวลา 3-5 ชั่วโมง จึงจะทราบผล เนื่องจากมีหลายขั้นตอน และต้องอาศัยเครื่องมือที่เฉพาะ ทั้งเครื่องสกัดสารพันธุกรรม เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง แต่ด้วยเป็นเครื่องขนาดใหญ่จึงสามารถทดสอบตัวอย่างได้จำนวนมากต่อครั้ง

ส่วนวิธี Rapid Real-time RT-PCR ที่มีการลดขั้นตอนทั้งหมดไว้ในเครื่องเดียว จะใช้เวลาเพียง 20-60 นาที แต่ทดสอบได้ครั้งละจำนวนน้อย ครั้งละ 1-4 ตัวอย่าง ซึ่งอาจไม่เหมาะสำหรับการค้นหาผู้ป่วยเชิงรุก (Active case finding) ที่ต้องตรวจตัวอย่างจำนวนมาก แต่อาจนำไปใช้ได้ในกรณีผู้ป่วยฉุกเฉิน ในจุดดูแลผู้ป่วย (POCT) หรือห้องปฏิบัติการเคลื่อนที่/Drive thru ที่ต้องให้บริการด้วยความสะดวกรวดเร็ว





2) ชนิดของสิ่งส่งตรวจ : สารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ ถือเป็นสิ่งส่งตรวจที่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อได้โดยตรง ซึ่งแต่ละชุดน้ำยาทดสอบจะมีการตรวจรับรองคุณภาพในสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดที่แตกต่างกันไป โดยส่วนใหญ่ ชุดน้ำยาของวิธี Standard Real-time RT-PCR จะผ่านการทดสอบครอบคลุมทั้งสิ่งส่งตรวจจากทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง รวมไปถึง posterior oropharyngeal (deep throat) และ saliva

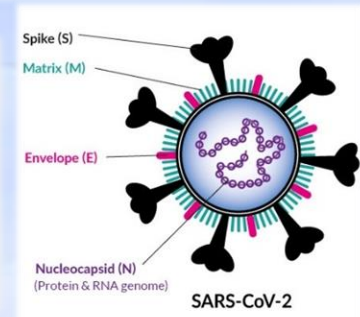
ส่วนชุดน้ำยาของวิธี Rapid Real-time RT-PCR ที่มีใช้ในปัจจุบัน มักระบุในเอกสารกำกับน้ำยาเพียงสิ่งส่งตรวจจากทางเดินหายใจส่วนบน (Nasal swab, Nasopharyngeal swab) จึงเป็นข้อสังเกตอย่างหนึ่งที่ต้องใช้ในการพิจารณาการแปลผลตรวจ



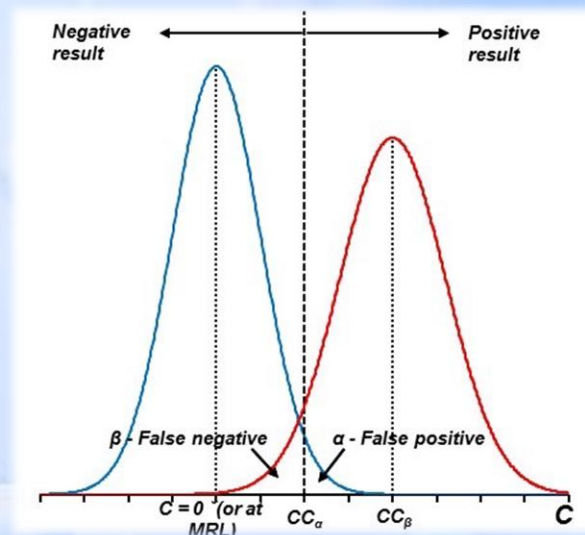
3) การตรวจจับยีนไวรัส : ชุดน้ำยาตรวจ Real-time RT-PCR ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายนั้น จะถูกออกแบบให้มีการตรวจจับยีนไวรัสที่ตำแหน่งต่างๆ กัน ตั้งแต่ 1-3 ตำแหน่ง โดยตรวจวัดปริมาณยีนไวรัสด้วยการวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ แสดงออกมาเป็นค่ารอบปฏิกิริยาที่ตรวจพบยีน (Cycle threshold; Ct) แล้วนำไปแปลผลว่าพบเชื้อ (Detected) หรือไม่พบเชื้อ (Non detected) ตามเกณฑ์ของชุดน้ำยา ซึ่งจะต้องตรวจพบยีนทุกยีนหรือทุกตำแหน่งบนยีนจึงจะแปลผลเป็น Detected ได้ ซึ่งจากวิธี Standard Real-time RT-PCR ที่สามารถตรวจจับยีนไวรัสแต่ละตำแหน่ง ที่คนละความเข้มแสง จึงสามารถแยกค่า Ct. ของตำแหน่งยีนและแปลผลได้ชัดเจน

แต่มีข้อสังเกตของบางชุดน้ำยาของวิธี Rapid Real-time RT-PCR ที่ตรวจจับยีนไวรัสที่ความเข้มแสงเดียว พบว่า ไม่สามารถอ่านผลแยกค่า Ct ของแต่ละตำแหน่งยีนได้ ดังนั้น หากตรวจพบเป็น Detected ด้วยวิธีดังกล่าว จึงจำเป็นต้องทดสอบซ้ำด้วยวิธี Standard Real-time RT-PCR เพื่อแยกว่าเป็น Detected จริง หรือ ผลกำกวม (Inconclusive) เนื่องจาก หากพบว่ามาจากการตรวจจับที่ทุกตำแหน่งยีน จะยังคงแปลเป็น Detected ดังเดิมได้ แต่หากมาจากการตรวจจับเพียงยีนใดยีนหนึ่ง จะแปลเป็น Inconclusive

ดังนั้น วิธี Rapid Real-time RT-PCR จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในกลุ่ม Urgency operations/ procedures ที่จำเป็นเร่งด่วน มากกว่าการนำไปใช้กับคนไข้ทั่วไป



4) ค่า **Limit of detection (LOD)** หรือ ปริมาณของยีนไวรัสค่าที่ต่ำสุดที่สามารถตรวจจับได้ ซึ่งปัจจุบันมีชุดน้ำยาของวิธี Rapid Real-time RT-PCR บางชนิด ที่มีประสิทธิภาพสูง จะมีค่า LOD ที่ต่ำกว่าวิธี Standard Real-time RT-PCR จึงเป็นผลให้ตรวจพบเชื้อปริมาณน้อยได้ด้วยวิธี Rapid Real-time RT-PCR แต่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธี Standard Real-time RT-PCR



จากข้อสังเกต 4 ข้อข้างต้นนั้น เป็นเพียงส่วนหนึ่งในความแตกต่างของ Standard กับ Rapid Real-time RT-PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ SARS-CoV-2 ในส่วนของการคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ของแต่ละโรงพยาบาลยังคงต้องอาศัยข้อมูลด้านอื่นๆ เพื่อประกอบการตัดสินใจเพิ่มเติม เช่น ด้านประสิทธิภาพ (Performance) ด้านราคา (Price) และ ที่สำคัญการวินิจฉัยและการดูแลผู้ป่วยจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยอื่นเพื่อประกอบการตัดสินใจในตามดุลยพินิจของแพทย์ผู้รักษา