

ที่ ยธ ๐๗๐๕.๓ / ๑๔๙๘

ถึง เรือนจำ ทัณฑสถาน สถานกักขัง สถานกักกัน

ด้วยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ส่งคำแนะนำการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสก่อโรคโควิด-๑๙ (SAR-COV-2) ทางห้องปฏิบัติการ ฉบับวันที่ ๒๘ พฤษภาคม ๒๕๖๔ เพื่อเผยแพร่ประชาสัมพันธ์และเป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสก่อโรคโควิด-๑๙ (SAR-COV-2) ทางห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้ มอบหมายให้ นายอธิวัฒน์ ปริมสิริคุณาวุฒิ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ โทร. ๐๒ ๙๕๑ ๐๐๐๐ ต่อ ๙๙๓๑๒ โทรสาร ๐๒ ๕๙๑ ๕๔๔๙ เป็นผู้ประสานงาน

ในการนี้ กรมราชทัณฑ์ จึงขอส่งคำแนะนำการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสก่อโรคโควิด-๑๙ (SAR-COV-2) ทางห้องปฏิบัติการ ฉบับวันที่ ๒๘ พฤษภาคม ๒๕๖๔ ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อให้เรือนจำและทัณฑสถาน รับทราบและถือปฏิบัติ รายละเอียดปรากฏตามเอกสารที่แนบมาท้ายนี้



กองบริการทางการแพทย์
โทร / โทรสาร ๐ ๒๙๖๗ ๓๓๕๓

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

คำแนะนำ
การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสก่อโรคโควิด-19 (SARS-CoV-2) ทางห้องปฏิบัติการ

■ การตรวจการติดเชื้อไวรัสโควิด-19 ทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจหาไวรัสหรือส่วนของไวรัสในสารคัดหลั่งจากทางเดินหายใจ

- การตรวจสารพันธุกรรม (Nucleic Acid Amplification Testing, NAAT) เป็น molecular test ตรวจหา viral RNA
- การตรวจหาแอนติเจน (antigen) เป็น immunology test ตรวจหา viral N-protein
- การเพาะแยกเชื้อไวรัส (viral isolation) ทั่วไปแล้วไม่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ จะใช้เฉพาะการวิจัยเพิ่มเติม

2. การตรวจเลือดหาแอนติบอดี (antibody) ต่อไวรัส

■ การตรวจหาไวรัสหรือส่วนของไวรัสในสารคัดหลั่งจากทางเดินหายใจ

1. การเก็บสิ่งส่งตรวจจากทางเดินหายใจเพื่อตรวจหาไวรัสหรือส่วนของไวรัส

1.1 ช่วงเวลาของการติดเชื้อที่ควรเก็บสิ่งส่งตรวจ

สำหรับระยะเวลาที่ได้รับเชื้อไวรัสแล้วยังตรวจไม่พบด้วยวิธีต่างๆ ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนในเซลล์ของระบบทางเดินหายใจจนมีปริมาณมากพอที่จะสามารถตรวจพบทางห้องปฏิบัติการได้ ขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลของระยะฟักตัวของ SARS-CoV-2 ที่แน่นอน ปริมาณไวรัสจะลดลงหลังเริ่มมีอาการ จึงตรวจพบไวรัสได้ในระยะแรกๆของการป่วยมากกว่าระยะต่อมา และมักจะตรวจพบเชื้อได้นานถึง 10 ถึง 15 วัน หลังเริ่มมีอาการ

ควรเก็บสิ่งส่งตรวจเมื่อพ้นระยะฟักตัวของไวรัส เข้าสู่ระยะแพร่เชื้อ คือ ***หลังจากรับเชื้อ 2-14 วัน ส่วนใหญ่ 3-7 วัน ค่าเฉลี่ย 5 วัน*** โดยใช้ค่านี้ทั้งในผู้ติดเชื้อที่มีอาการและไม่มีอาการ แนะนำให้เก็บตัวอย่างหลังสงสัยว่าสัมผัสเชื้อมาแล้ว 3-5 วัน

1.2. สิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาไวรัสหรือส่วนของไวรัส

- **สิ่งส่งตรวจจากการป้ายหลังโพรงจมูก (Nasopharyngeal swab)** และป้ายจากลำคอ (Throat swab) ซึ่งเป็นแหล่งที่มีเซลล์เป้าหมายสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัส แล้วใส่ใน viral transport media (VTM) หลอดเดียวกัน ซึ่งมีความเสี่ยง คือ ระหว่างการเก็บสิ่งส่งตรวจ ผู้ถูกเก็บสิ่งส่งตรวจอาจจะจามหรือไอ เกิดละอองฝอย ผู้เก็บสิ่งส่งตรวจจึงต้องป้องกันการรับเชื้อ ด้วยการสวม personal protective equipment (PPE) และใช้ระยะเวลานานในการเก็บและตรวจต่อราย ศักยภาพการเก็บสิ่งส่งตรวจจากหลังโพรงจมูก อาจมีข้อจำกัด หากมีสิ่งส่งตรวจจำนวนมาก

- **น้ำลาย** เป็นสิ่งส่งตรวจที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมได้ แต่ต้องมีปริมาตรที่มากพอ อย่างน้อย 3-5 มิลลิลิตร ทั้งนี้ความไวในการตรวจพบเชื้ออาจน้อยกว่าสิ่งส่งตรวจจากหลังโพรงจมูกและลำคอ แต่มีข้อดีสามารถเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ถูกตรวจจำนวนมากในแต่ละวัน ทั้งนี้ให้พิจารณาสถานการณ์การระบาด สถานที่ในการเก็บสิ่งส่งตรวจและปัจจัยอื่นๆ ประกอบด้วย

2. การตรวจสารพันธุกรรม (Nucleic Acid Amplification Tests, NAATs)

- สารพันธุกรรมของไวรัสโควิด-19 คือ **RNA (Ribonucleic acid)**

- เป็นการตรวจยืนยันการติดเชื้อ (confirmatory test) ที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูงมาก แต่การตรวจพบสารพันธุกรรมไม่สามารถบอกถึงการเข้าเซลล์และเพิ่มจำนวนได้ (infectivity) เราอาจจะตรวจพบ RNA ของ SARS-CoV-2 จากผู้ป่วยได้เป็นเวลานานหลายเดือนหลังการติดเชื้อ แต่ไม่ใช่ไวรัสที่ก่อโรคต่อไปได้ ดังนั้นการตรวจนี้จึงใช้สำหรับเพื่อการวินิจฉัย และไม่แนะนำให้ใช้เพื่อติดตามการรักษา นอกจากนี้ไม่ควรตรวจซ้ำในผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นผู้ติดเชื้อ ยกเว้นการตรวจเพื่องานวิจัย

- วิธีมาตรฐาน คือ **Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (rRT-PCR)** ซึ่งการตรวจในห้องปฏิบัติการแต่ละรอบใช้เวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมง โดยทั่วไปสามารถออกผลได้ภายใน 24 ชั่วโมง ขึ้นกับปริมาณสิ่งส่งตรวจ จำนวนบุคลากร และเครื่องตรวจ

- ในปัจจุบันมีชุดตรวจซึ่งให้ผลตรวจเร็วขึ้นและง่ายขึ้น เช่น loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) แต่ความถูกต้องของการตรวจน้อยกว่า rRT-PCR ชุดตรวจเหล่านี้หลายผลิตภัณฑ์ได้รับการขึ้นทะเบียนเครื่องมือแพทย์โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และพิจารณาให้ใช้ในบริบทที่ไม่สามารถตรวจด้วยวิธี rRT-PCR มาตรฐาน ได้ตามที่ควร

การรายงานผลการตรวจสารพันธุกรรม

แบบที่	รูปแบบการตรวจ	ผลการตรวจ	รายงานผล	
1	ตรวจมากกว่า 1 ยีนที่ต่างกัน	ตรวจ *ไม่พบ* ทุกยีน	not detected	**ไม่พบสารพันธุกรรม**
2	ตรวจ 1 ยีน มากกว่า 1 ตำแหน่ง	ตรวจ *ไม่พบ* ยีนทุกตำแหน่ง		
3	ตรวจมากกว่า 1 ยีนที่ต่างกัน	ตรวจ *พบ* ทุกยีน	detected	**พบสารพันธุกรรม**
4	ตรวจ 1 ยีน มากกว่า 1 ตำแหน่ง	ตรวจ *พบ* ยีนทุกตำแหน่ง		
5	ตรวจมากกว่า 1 ยีนที่ต่างกันหรือตรวจ 1 ยีนมากกว่า 1 ตำแหน่ง	ตรวจ *ไม่พบ* ตามเกณฑ์ของชุดตรวจ	inconclusive	**สรุปไม่ได้**

- โดยให้เลือกใช้ชุดตรวจที่มีการตรวจสารพันธุกรรมเป้าหมายของเชื้อ SAR-CoV-2 มากกว่า 1 ยีนที่ต่างกัน (ทั่วไปอย่างน้อย 2 ยีน) หรือตรวจ 1 ยีน มากกว่า 1 ตำแหน่งที่ต่างกัน โดยการแปลผลให้ยึดตามเอกสารกำกับชุดน้ำยา

3. การตรวจหาแอนติเจน (antigen) ของไวรัส

- แอนติเจนที่ตรวจหาคือ Nucleocapsid protein (N-protein) ของไวรัส
- วิธีตรวจต่างๆ ได้แก่
  - *Immunochromatography* เคยถูกเรียกว่า rapid antigen test ปัจจุบัน ให้ใช้คำว่า Antigen assay และ Antigen test kit โดยไม่มีคำว่า rapid นำหน้า สามารถใช้เป็น point-of-care test ในกรณีที่น้ำยาทำละลายของบริษัทมีสารฆ่าไวรัส แต่ถ้าไม่มีการระบุต้องทดสอบในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย ระดับ 2 ขึ้นไป
  - *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA)
  - *Chemiluminescence immunoassay (CLIA)*

ข้อควรพิจารณาในการตรวจหาแอนติเจน

1. อาจใช้กับคนที่น่าจะมีไวรัสปริมาณมาก เช่น ผู้ที่มีอาการของโควิด-19 (Symptomatic cases) ในระยะแรกๆของการดำเนินโรคซึ่งจะให้ความถูกต้องสูง แต่ผู้ที่มีผลตรวจเป็นลบก็ควรได้รับการตรวจเพิ่มเติม ไม่ควรใช้ตรวจคัดกรองในคนที่ไม่มีอาการเพราะมีโอกาสที่จะให้ผลบวกลวงและผลลบลวงได้มาก

2. อาจใช้กับคนที่จำเป็นต้องทราบผลการตรวจเร็วในเบื้องต้นก่อน เพื่อการบริหารจัดการอย่างรวดเร็วก่อนที่จะได้รับผลการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน rRT-PCR

3. กรณีที่ควรตรวจยืนยันด้วย rRT-PCR ได้แก่

- ผลตรวจเป็นลบ ในผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ เช่น ผู้ที่มีอาการและมีประวัติสัมผัสใกล้ชิดผู้ติดเชื้อ

- ผลตรวจเป็นบวก ในผู้ที่มีความเสี่ยงต่ำต่อการติดเชื้อ เช่น ผู้ที่ไม่มีอาการ ไม่มีประวัติเสี่ยงต่อการรับเชื้อ กลุ่มคนที่มีความชุกของการติดเชื้อต่ำ หรือ ในช่วงเวลาที่มีเชื้อน้อย เช่น ผู้ที่ไม่มีประวัติสัมผัสผู้ติดเชื้อ ผู้ที่ไม่มีอาการ หรือมีอาการมานานแล้ว

ข้อควรระวัง สำหรับการตรวจหาแอนติเจน มีโอกาสที่จะเป็นผลบวกลวงหรือ ผลลบลวงได้ ด้วยเหตุและสถานการณ์ ต่อไปนี้

- ผู้ทำการตรวจไม่ปฏิบัติตามแนวทางการตรวจที่ถูกต้อง เช่น การเก็บสิ่งส่งตรวจไม่ตรงตามคำแนะนำ การอ่านผลไม่เป็นไปตามเวลาที่กำหนด การเก็บรักษาชุดตรวจไม่ถูกต้อง
- มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มจากไวรัสอื่นที่ไม่ใช่ไวรัสก่อโรคโควิด-19

4. การเลือกวิธีตรวจหาไวรัสทางห้องปฏิบัติการตามวัตถุประสงค์ต่างๆมีดังนี้

4.1 การวินิจฉัยยืนยันการติดเชื้อในผู้ป่วยที่อยู่ระหว่างการสอบสวนโรค (patient under investigation: PUI) วิธีมาตรฐานคือวิธี rRT-PCR โดยใช้สิ่งส่งตรวจจากหลังโพรงจมูกและลำคอ หรือโพรงจมูกอย่างเดียว

4.2 การค้นหาผู้ป่วยเชิงรุก (Active case finding)

- **ในกรณีที่มีผู้ป่วยไม่มาก การระบาดอยู่ในวงจำกัด** สามารถเก็บสิ่งส่งตรวจจากหลังโพรงจมูกและป้ายจากลำคอได้ และตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน คือ rRT-PCR
- **ในกรณีที่มีการระบาดในวงกว้าง มีผู้เสี่ยงติดเชื้อจำนวนมาก ความชุกของโรคสูง** อาจใช้การตรวจจากน้ำลายได้ และควรตรวจแบบรายบุคคล หรือสามารถใช้การตรวจด้วยเทคนิคอื่นเพื่อการคัดแยกผู้ป่วย (triage) และการบริหารจัดการอย่างเหมาะสมและรวดเร็ว เช่น LAMP, CRISPR โดยผลบวกควรได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐาน และควรเฝ้าระวังผู้ที่มีตรวจเป็นลบ เนื่องจากความไวของการทดสอบวิธีนี้ต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน
- **ในการสำรวจทางระบาดวิทยา หรือตรวจคนหมู่มากในพื้นที่เสี่ยง ที่มีความชุกของโรคต่ำ** สามารถใช้การตรวจแบบรวมสิ่งส่งตรวจ (pooled sample) ได้มีข้อแนะนำจากห้องปฏิบัติการหลักของประเทศไทย ให้รวมสิ่งส่งตรวจจากหลังโพรงจมูกและป้ายจากลำคอ 4 ราย ต่อ 1 pool หรือ รวมสิ่งส่งตรวจน้ำลาย 5 รายต่อ 1 pool

<u>หมายเหตุ</u> ในกรณีที่การตรวจครั้งแรกให้ผลลบไม่ว่าจะตรวจด้วยวิธีใดๆ แต่ผู้ป่วยมีอาการเข้าได้กับการติดเชื้อ SAR-CoV-2 หรือเป็นกลุ่มผู้สัมผัสเสี่ยงสูง ควรเก็บสิ่งส่งตรวจใหม่เพื่อตรวจ rRT-PCR ซ้ำอีกครั้ง

■ การตรวจเลือดหาแอนติบอดี (antibody) ต่อไวรัส

เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อ nucleoside protein (N-protein) หรือ spike-protein (S-protein) ของไวรัส SARS-CoV-2

1. ประเภทของการตรวจ

1.1 การตรวจ Binding antibody (BAb) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นจากการได้รับเชื้อหรือการได้รับวัคซีน โดยจะมีปฏิกิริยาจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเชื้อ ทำหน้าที่กระตุ้นระบบภูมิต้านทานให้มากำจัดไวรัส เช่น เม็ดเลือดขาว แต่ไม่สามารถยับยั้งการเข้าเซลล์และการเพิ่มจำนวนของไวรัส แบ่งชุดตรวจแอนติบอดีกลุ่มนี้ได้เป็น 3 ชนิด

- Rapid antibody test ที่เรียกว่า ชุดตรวจหาแอนติบอดีแบบรวดเร็ว
- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- Chemiluminescence immunoassay (CLIA)

หมายเหตุ ในปัจจุบันยังไม่มีข้อบ่งใช้สำหรับการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน หลังจากการฉีดวัคซีน

1.2 การตรวจ Neutralizing antibody (NAb) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ยับยั้งการเข้าเซลล์และเพิ่มจำนวนของไวรัส การตรวจชนิดนี้ต้องทำในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 (BSL-3) หลักการคือ ผสมซีรัมที่ต้องการหา NAb ที่เจือจาง ในอัตราส่วนต่างๆ กับไวรัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในปริมาณที่กำหนด หลังจากบ่ม (incubate) ไว้ระยะเวลาหนึ่งแล้ว จึงนำมาใส่ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่จำเพาะกับไวรัส ถ้าในซีรัมนั้นมีแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้น ก็จะยับยั้งไม่ให้ไวรัสก่อการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในเซลล์

2. ข้อบ่งใช้การตรวจหาแอนติบอดี

1. ใช้ในกรณีที่การตรวจด้วยวิธี rRT-PCR ให้ผลลบ และตรวจซ้ำแล้วยังคงได้ผลลบ แต่มีอาการทางคลินิกที่เข้าได้กับโรคโควิด-19 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่มาพบแพทย์ล่าช้า จึงอาจมีปริมาณไวรัสต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection) ด้วยวิธี rRT-PCR หรือในกรณีที่ไม่สามารถเก็บสิ่งส่งตรวจจากทางเดินหายใจได้
2. ใช้สนับสนุนการวินิจฉัยร่วม ในกรณีที่ rRT-PCR ให้ผลบวก
3. ใช้ในการสำรวจทางระบาดวิทยา หรือศึกษาความชุกของการติดเชื้อที่ผ่านไปแล้วในชุมชน
4. กรณีการตรวจเพื่อบ่งบอกการตอบสนองต่อวัคซีน สามารถใช้ในระดับงานวิจัย โดยไม่จำเป็นต้องตรวจเป็นการทั่วไป ทั้งนี้จะต้องใช้ spike protein หรือ receptor domain เป็นแอนติเจนทดสอบ

3. การแปลผลการตรวจหาแอนติบอดี

3.1 การตรวจที่ให้ผลลบ

- เนื่องจากแอนติบอดีต่อ SARS-CoV-2 เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อ 1-3 สัปดาห์ การตรวจเลือดก่อนหน้านั้น จะไม่พบแอนติบอดี หรือถ้าใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ ก็เรียกว่า ผลลบลวง
- หากเป็นการตรวจย้อนหลังเกิน 3 สัปดาห์หลังการสัมผัสเชื้อ หรือผู้นั้นไม่เคยมีประวัติการสัมผัสเชื้อ การตรวจที่ให้ผลลบแปลว่า ผู้นั้นไม่เคยติดเชื้อ

3.2 การตรวจที่ให้ผลบวก

- ผู้นั้นเคยติดเชื้อ SARS-CoV-2 หรือได้รับวัคซีนต่อไวรัสชนิดนี้ นอกจากนี้พบว่าผู้ที่มีทั้ง IgG และ IgM บางรายอาจให้ผล rRT-PCR เป็นบวกได้ เนื่องจากอยู่ในระยะฟื้นตัวจากการติดเชื้อ
- ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอที่จะบอกว่าผู้ที่ตรวจพบแอนติบอดีมีภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อเพียงไร แต่น่าจะมีความรุนแรงของโรคลดลงหากมีการติดเชื้อ และยังอาจติดเชื้อและแพร่เชื้อให้คนอื่นได้ ยังจำเป็นต้องปฏิบัติตามแนวทางการป้องกันการติดเชื้อและแพร่เชื้อ
- ผลบวกลวง และผลลบลวงเกิดขึ้นได้ ต้องเลือกใช้และแปลผลอย่างถูกต้องประกอบกับข้อมูลอื่นๆ และ ไม่ใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อในขณะนั้น

4. การควบคุมการใช้ชุดตรวจหาแอนติบอดีในประเทศไทย

ชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ต้องผ่านการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) โดยมีเกณฑ์หลักในการพิจารณาดังนี้

- ความไวเชิงวินิจฉัย (Sensitivity) ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 85 จำนวนสิ่งส่งตรวจ ไม่ต่ำกว่า 50 ราย
- ความจำเพาะเชิงวินิจฉัย (Specificity) ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 98 จำนวนสิ่งส่งตรวจ ไม่ต่ำกว่า 100 ราย
- ความไม่จำเพาะ (Non-specificity) ไม่มากกว่าร้อยละ 10 จำนวนสิ่งส่งตรวจ ไม่ต่ำกว่า 20 ราย
- กำหนดให้จำหน่ายได้เฉพาะสถานพยาบาล โรงพยาบาลเฉพาะทาง คลินิกเวชกรรม คลินิกเฉพาะทางด้านเวชกรรม คลินิกเทคนิคการแพทย์หรือสหคลินิก ที่จัดให้มีการประกอบวิชาชีพเวชกรรมหรือเทคนิคการแพทย์ ตามกฎหมายว่าด้วยสถานพยาบาล ทั้งนี้ การตรวจและการแปลผลต้องทำโดยบุคลากรทางการแพทย์เท่านั้น ห้ามประชาชนนำมาตรวจด้วยตนเอง เนื่องจากจะต้องใช้วิธีตรวจและการแปลผลโดยผู้เชี่ยวชาญ และหากผิดพลาด จะเป็นอันตรายต่อตนเอง และการควบคุมการระบาดของโรค