

การตรวจโควิด-19 จากน้ำลาย

แก้ปัญหานึง...แต่อาจสร้าง...อีกหลายปัญหา



ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.พีไลพันธ์ พุทธิวัฒน์

นายกสมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศไทย)

การตรวจสารพันธุกรรม (RNA genome) ของเชื้อ SARS-CoV-2 ในห้องปฏิบัติการทั่วโลกรวมทั้งไทย จะใช้ตัวอย่างตรวจที่เก็บจากระบบทางเดินหายใจ ที่นิยมกันมาก คือ nasopharyngeal (NP) swab ร่วมกับ oropharyngeal (OP)/throat swab หรือ NP swab เพียงอย่างเดียว ต่อมาทีมงานวิจัยที่รายงานว่าน้ำลายเป็นตัวอย่างตรวจที่อาจมีจีโนมของเชื้อไวรัสอยู่เป็นจำนวนมาก แต่จะมากหรือน้อยกว่าที่พบใน NP swab ยังมีความแตกต่างกันไปในแต่ละรายงาน ในช่วงท้ายของการระบาดระลอกแรกในประเทศไทยก็ได้มีการตรวจตัวอย่างน้ำลายมาแล้ว แต่ก็ยังไม่เป็นที่นิยมทั่วไป ในการระบาดรอบใหม่ที่สมุทรสาคร มีการทำ active case finding ซึ่งมีตัวอย่างตรวจเป็นจำนวนมากมาในแต่ละวัน จนทำให้เจ้าหน้าที่ที่ออกสืบสวนโรคภาคสนามทำงานไม่ทัน เกิดคอขวดในการที่อาสาสมัครนับร้อยคน ต้องเข้าคิว

รอเก็บตัวอย่าง NP swab ทำให้มีการนำเอาตัวอย่างน้ำลายมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมอีกครั้งหนึ่ง จนกระทั่งเกิดนโยบายการตรวจ pooled saliva samples โดย 1 pool ประกอบด้วย 5 ตัวอย่าง และถ้า pool ใดให้ผลบวกหรือ genome detected ก็จะต้องย้อนกลับไปเอาแต่ละตัวอย่างใน pool นั้น มาทดสอบซ้ำอีกครั้งว่าผลบวกนั้นมาจากตัวอย่างของผู้ใด (ดูประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ในความพยายามที่จะแก้ปัญหาหนึ่งนั้นถ้าพิจารณา รอบคอบแล้วอาจพบว่าทำให้เกิดผลกระทบอื่นอีกหลายด้าน รวมทั้งเป็นการสร้างปัญหาให้กับผู้ปฏิบัติงานตรวจสารพันธุกรรมไวรัสในหลายห้องปฏิบัติการที่ไม่มีโอกาสได้บอกกล่าวอธิบายถึงสิ่งที่เกิดขึ้น การตรวจน้ำลายมีข้อดีมากกว่าการตรวจโดยใช้ swab samples จริงหรือไม่ เป็นประเด็นที่น่าจะพิจารณาทบทวน

การตรวจน้ำลายมีความไวสูงไม่แตกต่างจากการตรวจ NP swab samples จริงหรือ

คงปฏิเสธไม่ได้ว่าผลงานวิจัยจากโรงพยาบาลรามาริธติมีส่วนสำคัญในการผลักดันให้เกิดนโยบายการตรวจน้ำลาย (Pasomsub, et al. Clin Microbiol Infect 2020 doi: 10.1016/j.cmi.2020.05.001) งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในผู้ที่มารับการตรวจที่คลินิกโรคทางเดินหายใจของโรงพยาบาลรามาริธติจำนวน 200 ราย พบว่าการใช้ตัวอย่าง NP+throat swab samples สามารถตรวจพบผู้ติดเชื้อได้ 19 ราย (9.5%) และการตรวจโดยใช้ตัวอย่างน้ำลายจะพบผู้ติดเชื้อ 16 ราย (8%) ดังนั้นเมื่อเทียบกับ NP+throat swab samples แล้ว ผลการตรวจน้ำลายมีความไวสูงถึง 84.2% และมีความจำเพาะ 98.9% แต่ถ้าเทียบกับผลวิจัยของสถาบันป้องกันควบคุมโรคเขตเมือง (สปคม.) แล้ว ผลที่ได้จะแตกต่างจากของโรงพยาบาลรามาริธติค่อนข้างมาก การศึกษาของ สปคม. นั้น เป็นการศึกษาในผู้ที่ถูกกักตัวอยู่

ใน state quarantine จำนวน 235 ราย การเก็บน้ำลาย และ NP swab เก็บในเวลาใกล้เคียงกัน โดยในการเก็บน้ำลายผู้ถูกกักตัวจะทำหลังตื่นนอน ก่อนแปรงฟัน รับประทานอาหาร และดื่มน้ำ ผลการวิจัยพบว่าการใช้ NP swab samples สามารถตรวจพบผู้ติดเชื้อได้ 32 ราย (13.7%) แต่การตรวจน้ำลายจะพบผู้ติดเชื้อเพียง 12 ราย (5.2%) เท่านั้น ดังนั้นเมื่อเทียบกับ NP swab samples แล้ว ผลการตรวจน้ำลายมีความไวเพียง 37.5% แต่มีความจำเพาะสูงถึง 100% (อยู่ระหว่างการส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์) งานวิจัยทั้งสองเรื่องนี้เป็นการตรวจ single saliva sample เหมือนกัน แต่ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจจะแสดงถึงความแตกต่างของอาสาสมัคร และความเป็น hospital settings หรือการศึกษาระบาดวิทยาในภาคสนาม

การเก็บตัวอย่างน้ำลาย สะดวก ประหยัด รวดเร็ว และบุคลากรทางการแพทย์

มีความปลอดภัย จริงแค่ไหน

การเก็บ NP swab ผู้เก็บต้องเป็นแพทย์ พยาบาล หรือนักเทคนิคการแพทย์ ที่ได้รับการฝึกฝนมาแล้วเท่านั้น แต่การเก็บตัวอย่างน้ำลายนั้น ผู้ป่วยหรือผู้ถูกเก็บสามารถบ้วนหรือขากน้ำลายได้เอง จึงน่าจะเป็นการลดความเสี่ยงของเจ้าหน้าที่ การเก็บน้ำลายใช้เวลาไม่นาน ไม่ต้องใช้ viral transport media (VTM) หรือ universal transport media (UTM) และไม่ต้องใช้ swab จึงน่าจะประหยัดกว่า นอกจากนี้การเก็บน้ำลายยังไม่ invasive ไม่ก่อให้เกิดความเจ็บระคายเคืองต่อผู้ป่วย โดยเฉพาะในรายที่ต้องถูกเก็บตัวอย่างหลายครั้ง

ในโรงพยาบาลจะเห็นภาพของพยาบาลใส่ หน้ากากอนามัย แนะนำวิธีการบ้วนน้ำลายพร้อมกับมอบกระปุกใส่น้ำลายและถุงซิปล (zip locked bag) ให้ผู้มารับการตรวจไปบ้วนน้ำลายประมาณ 2 มล. ในที่ที่อากาศถ่ายเทได้ดี แต่ในการปฏิบัติการภาคสนามนั้นการเก็บตัวอย่างทำในเต็นท์ เจ้าหน้าที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างจะแต่งตัวโดยใช้อุปกรณ์เต็ม (personal protective device) และต้องสวม cover-all gown ด้วยเนื่องจากผู้ถูกเก็บตัวอย่างจะต้องทำการบ้วน หรือขากน้ำลายลงในกระปุก

ต่อหน้าเจ้าหน้าที่ ปริมาณน้ำลายที่ทางกรมวิทย์ฯ แนะนำ คือ 3-5 มล. จึงจะมีโอกาสสูงที่จะตรวจพบเชื้อได้ ซึ่งจะใช้เวลาในการบ้วนประมาณ 5 นาที เมื่อบ้วนเสร็จก็จะใส่กระปุกลงในถุงซิปล เมื่อคนหลายร้อยคนทำการบ้วนน้ำลายในบริเวณเดียวกัน ละอองฝอยที่เกิดขึ้นน่าจะมีจำนวนมากมายมหาศาล เมื่อเทียบกับการเก็บ NP swab และละอองฝอยนั้นอาจไม่ได้มีแค่เชื้อก่อโรค covid-19 เท่านั้น แต่ยังรวมไปถึงเชื้อวัณโรค หรือเชื้ออื่น ๆ ด้วย ซึ่งสร้างความกังวลให้แก่ผู้ออกทำการสอบสวนโรคที่ต้องทำหน้าที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงโดยไม่ได้แต่ง อุปกรณ์ป้องกันเต็มที สิ่งแวดล้อมจะกลายเป็นแหล่งแพร่เชื้อให้แก่ผู้ที่มาทำหน้าที่สังเกตการณ์ นักข่าว และเจ้าหน้าที่ฝ่ายปกครองในบริเวณนั้นได้ และการขนส่งกระปุกน้ำลายไปส่งห้องปฏิบัติการนั้นก็ไม่ได้สะดวกเลยเมื่อเทียบกับการขนส่งหลอดใส่ NP swab เนื่องจากต้องใช้กล่องขนาดใหญ่จำนวนมาก ความเย็นกระจายไม่ทั่วถึง และไม่สามารถจัดเรียงกระปุกน้ำลายให้ตั้งตรงอย่างเป็นระเบียบได้

ความเสี่ยง และ ความไม่สะดวกของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ

ความเสี่ยง และความไม่สะดวกของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการผู้ทำหน้าที่อยู่เบื้องหลังการสอบสวนโรค เริ่มตั้งแต่ต้องนำถุงซิปลใส่กระปุกน้ำลายไปเปิดในตู้ชีวนิรภัย บางกระปุกมีรอยน้ำลายเปรอะเปื้อนภายนอก ซึ่งอาจเกิดขึ้นตั้งแต่ขั้นตอนการบ้วนกระปุกน้ำลายเป็นกระปุกที่บวมมองไม่เห็นภายใน กระปุกที่เอียงในขณะขนส่งจะมีน้ำลายเอ่ออยู่ที่ฝา และถ้าเปิดไม่ระวังน้ำลายอาจกระเซ็นออกมา ในการเก็บ NP swab นั้นเจ้าหน้าที่สาธารณสุขเป็นผู้ควบคุมและดูแลความปลอดภัยของทั้งระบบ แต่ในการเก็บน้ำลาย ความปลอดภัยส่วนหนึ่งของเจ้าหน้าที่ต้องขึ้นอยู่กับผู้ถูกเก็บด้วย บางตัวอย่างได้น้ำลายน้อยมากจนเมื่อไปถึงแล็บก็แห้งติดกัน

กระปุกแล้ว และเจ้าหน้าที่ที่เก็บก็คงมองไม่เห็นเหมือนกันว่าเก็บได้เพียงพอหรือไม่ และอีกปัญหาเร่งด่วน คือห้องปฏิบัติการมีตู้เย็นไม่เพียงพอที่จะเก็บกระปุกน้ำลายจำนวนมากเพื่อรอกระบวนการตรวจที่ยังไม่เสร็จสิ้นเพราะการเก็บกระปุกต้องใช้เนื้อที่มากกว่าการเก็บหลอด swabs น้ำลายที่เก็บมาแล้วนานหลายชั่วโมงกว่าจะได้ตรวจส่งกลิ่นเหม็น เนื่องจากมี normal flora อยู่ในน้ำลายของทุกคน มากบ้างน้อยบ้างแตกต่างกันไป ถุงซิปลที่ใช้แล้วถือเป็นขยะติดเชื้อซึ่งมีเป็นจำนวนมาก ดังนั้นภาระที่เพิ่มขึ้นก็คือ จะต้องทำการนี้ autoclave ก่อนส่งออกไปทิ้ง

ความแม่นยำถูกต้องของผลจากห้องปฏิบัติการ

ในขณะนี้ห้องปฏิบัติการหลายแห่งมีความกังวลในเรื่องการเตรียมตัว และความพร้อมที่จะทำการตรวจน้ำลายด้วยหลายเหตุผล คือ

น้ำยาที่ใช้ในการตรวจ ในประเทศไทยมีน้ำยาหลากหลายชนิดที่ผ่านเกณฑ์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) และใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการของทั้งภาครัฐ และเอกชน ถ้าไปดูในเอกสารกำกับน้ำยาจะพบว่า น้ำยาของบริษัทส่วนใหญ่เขียนระบุไว้เพียงให้ใช้กับตัวอย่างที่เป็น NP หรือ OP swab เท่านั้น มีน้ำยาเพียงส่วนน้อยที่ระบุว่าสามารถใช้ได้กับทั้ง swab และน้ำลาย ประเด็นสำคัญก็คือ ถ้าน้ำยาบริษัทนี้ไม่ได้ถูก validate มาให้ใช้กับตัวอย่างน้ำลาย ผลที่ได้จากการตรวจน้ำลายจะมีความถูกต้องแม่นยำเพียงใด นำที่จะ

ปัญหาด้านเทคนิคในห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจะต้องทำให้น้ำลายที่อยู่ในกระปุกเป็น homogeneous suspension เสียก่อนที่จะดูด (ปิเปตต์) ตัวอย่างตรวจเอาไปทำการสกัด RNA ถ้าเป็น NP swab ซึ่งอยู่ใน VTM ขั้นตอนนี้จะง่ายเพราะสามารถผสมตัวอย่างให้เป็น homogeneous suspension ได้ โดยการใช้น vortex mixer แต่ mixer นี้ ไม่รองรับกระปุกน้ำลาย เจ้าหน้าที่จะต้องใช้ automatic pipette ดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง เพื่อทำให้น้ำลายกลายเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ก็ใช้เวลาานมากต่อ 1 ตัวอย่าง ถึงแม้จะเติม VTM ลงไปช่วยให้ความหนืดลดลงแล้วก็ตาม นอกจากนี้ในขั้นตอนของการดูดน้ำลายเพื่อเอาไปสกัด RNA นั้น แม้ จะ fix scale ของ automatic pipette เอาไว้ก็ตาม

ปัญหาจากธรรมชาติของตัวน้ำลายเอง น้ำลายมีเอนไซม์หลายชนิดที่ช่วยย่อยอาหารในปาก เอนไซม์เหล่านี้ย่อยสลายโปรตีนและสารพันธุกรรมของไวรัสได้เช่นกัน (อาจทำให้เกิดผลลบปลอม) น้ำลายมีน้ำหมากปน เนื่องจากชาวเมียนมาร์ส่วนหนึ่งยังนิยมเคี้ยวหมาก (อาจมี PCR inhibitor ทำให้เกิดผลลบปลอมเช่นกัน) น้ำลายบูดเน่าได้

ได้มีการศึกษานำร่องก่อน แต่ดูเหมือนได้มีการตัดสินใจไปแล้วเพราะไม่มีเวลาพอที่จะทำการทดลอง ซึ่งหลักปฏิบัติตามมาตรฐานสากลอ้างอิงจาก Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ได้ระบุไว้ชัดเจนว่าหากมีการทำการ modified การทดสอบที่นอกเหนือจากที่ชุดน้ำยาได้กำหนดไว้ แม้ชุดทดสอบนั้นจะได้รับรองคุณภาพจาก CE IVD : European Conformity In Vitro Diagnostic หรือ FDA : Food and Drug Administration มาแล้วก็ตาม ต้องมีการ validate ชุดทดสอบนั้นใหม่ได้รูปแบบ

แต่การปิเปตต์น้ำลายที่มีความหนืดก็จะได้ปริมาณตามที่ตั้งค่าไว้ ผู้ที่มีประสบการณ์จะพบว่าการปิเปตต์ของเหลวที่มีความหนืดกับการดูดบัฟเฟอร์หรือน้ำนั้นจะได้ปริมาณไม่เท่ากัน แม้แต่การใช้ automatic extractor ในการสกัด RNA ก็ จะเกิดปัญหานี้เช่นกัน เครื่องดูดตั้งค่ามาสำหรับการดูดบัฟเฟอร์ซึ่งเป็นของเหลวใส แต่เมื่อนำมาใช้ดูดน้ำลาย ถ้าสังเกตให้ดีจะพบว่า probe หรือ เซ็มดูดของเครื่องจะดูดน้ำลายไม่ขึ้น หรือดูดได้ปริมาณไม่ครบ น้ำลายที่มีความหนืดต่าง ๆ กันก็ จะถูกดูดเอาไปสกัดในปริมาณที่ไม่เท่ากันด้วย

จะเห็นว่าผลที่ได้จากการตรวจน้ำลายจะมีความแม่นยำ และอาจมี reproducibility ค่อนข้างต่ำ

เนื่องจากแบคทีเรียในช่องปากเกิด overgrowth รวมทั้งเศษอาหาร ยาอม หรืออื่นๆที่อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ จะเห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างส่งผลต่อคุณภาพและความน่าเชื่อถือของผลแล็บทั้งสิ้น แต่เป็นสิ่งที่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการไม่สามารถควบคุม และแก้ไขได้ด้วยตนเองแต่ลำพัง

ความอ่อนล้าของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ไม่เคยมีใครรู้

ประชาชนส่วนใหญ่เคยได้เห็นความทุ่มเท อุทิศตนของแพทย์ พยาบาล เจ้าหน้าที่อาสาสมัคร สาธารณสุข นักระบาดวิทยาที่ออกสอบสวนโรค โควิด-19 แต่ใครเคยเห็นความอ่อนล้าของ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและรู้กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในห้องปฏิบัติการบ้าง เราแก้ปัญหาที่พบเห็นได้จากภายนอกโดยเอาปัญหานั้นเข้ามาเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการ คอขวดที่เกิดจากการรอคอย เพื่อรับการเก็บตัวอย่างหายไป แต่จะเกิดคอขวดที่ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทำงานออกผลไม่ทัน หรือ ผลแล็บแฉ่ง ทุกวันนี้คิดว่าจะเก็บของเสร็จงานก็ ค่ำมืดตึกตื่นแล้ว จากการสอบถามเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหลายแห่งไม่มีใครชอบการตรวจ น้ำลายเลย ถึงกับกล่าวว่าตรวจ NP swab 1000 ตัวอย่าง ยังดีกว่าตรวจน้ำลาย 500 ตัวอย่าง ที่ เจ้าหน้าที่ตรวจน้ำลายกันอยู่ก็เพราะหัวหน้าขอให้

ช่วย ๆ กัน มันเป็น spirit ของคนที่อ่อนล้า เรา ไม่ได้อยากให้คนทำงานมีความสุข และภูมิใจกับ งานที่ตนเองทำหรือ

ถ้ามีความจำเป็นต้องทำ การตรวจ pooled NP swab samples จะยังให้ผลที่น่าเชื่อถือ และมี reproducibility มากกว่าการ ตรวจ pooled saliva samples แต่เป็นที่ทราบ กันดีอยู่แล้วว่าการ pool samples นั้นจะเหมาะกับพื้นที่ที่มี prevalence ของการติดเชื้อต่ำเท่านั้น เพราะในพื้นที่ที่ prevalence ของการติดเชื้อสูง จำนวน pools ที่ให้ผลบวกจะมีมาก การตรวจซ้ำ เพื่อ identify ว่าตัวอย่างใดใน pool ที่ทำให้เกิดผลบวกจะสิ้นเปลืองมากกว่า และยังเกิดคอขวด ไม่สามารถออกผลได้เร็วตามที่ควรจะเป็นด้วย