

Laboratory testing for the Monkeypox virus (MPXV)

Interim guidance 2022

(รวบรวมจาก WHO, US-CDC, PAHO, UK-GOV)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน

หน่วยงานจำเป็นต้องประเมินความเสี่ยงด้านห้องปฏิบัติการ (Local risk assessment) ก่อนเสมอ เพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม แม้ว่า monkeypox virus จัดเป็นเชื้อในกลุ่ม Hazard Group (HG) 3 pathogen แต่สามารถใช้ห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 2 เสริมสมรรถนะ* (ยกเว้นการแยกเชื้อหรือขยายปริมาณเชื้อจำเป็นต้องปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3) โดยใช้มาตรการที่ลดโอกาสเสี่ยง ได้แก่ เตรียมตัวอย่างในตู้ชีวนิรภัย (certified Biosafety cabinet class II) เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของตัวอย่าง รวมถึงการปนตัวอย่างจำเป็นต้องมีฝาท่ออากาศที่ใส่ตัวอย่างก่อนนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ผู้ปฏิบัติงานไม่จำเป็นต้องมีประวัติฉีดวัคซีนป้องกันไข้ทรพิษ

หมายเหตุ* อยู่ระหว่างคณะกรรมการเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พิจารณานุโลมให้ใช้ห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 2 เสริมสมรรถนะ

การตรวจ Biochemistry, Hematology และ Urinalysis ในโรงพยาบาล

ใช้ห้องชีวนิรภัยระดับ 2 จำกัดจำนวนคนที่เข้าปฏิบัติงาน และสวมชุด PPE ตามมาตรฐานการปฏิบัติงาน (standard clinical laboratory precautions) หากการทดสอบก่อให้เกิดการฟุ้งกระจาย ผู้ปฏิบัติงานต้องใส่หน้ากาก N95 หรือ FFP2 respirator

การตรวจหาสารพันธุกรรม Monkeypox virus (MPXV)

ตามกฎหมายของประเทศไทย ให้ดำเนินการในห้องชีวนิรภัยระดับ 3 สวมชุด PPE ตามมาตรฐานการปฏิบัติงานและใส่หน้ากาก N95 หรือ FFP2 respirator

วิธี PCR ถือเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจยืนยัน MPXV ซึ่งอาจเป็นการผสมผสานด้วยวิธี PCR และ DNA sequencing หรือ PCR 1-2 ขั้นตอน เช่น

1. Real-time PCR ตรวจหา Genus orthopoxvirus (OPXV) และทดสอบอีกครั้งด้วย Real-time PCR จำเพาะต่อ Monkeypox virus (MPXV)
2. Real-time PCR ตรวจหา Genus orthopoxvirus (OPXV) และทดสอบต่อด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อหาชนิดที่จำเพาะต่อ Monkeypox virus (MPXV)
3. Real-time PCR จำเพาะต่อ Monkeypox virus (MPXV) และอาจทดสอบอีกครั้ง เพื่อจำแนกเป็น Congo/Central Basin และ West African clades

การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมหรือการแยกเชื้อ

เก็บของเหลวในตุ่มน้ำ (vesicles) หรือ ตุ่มหนอง (pustules) ปริมาณ 0.5–1 มล. โดยทำความสะอาดตุ่มแผลด้วย 70 % แอลกอฮอล์ ใช้ disposable syringe พร้อมเข็มเจาะและดูดน้ำในตุ่มแผล เก็บใส่หลอดปราศจากเชื้อ ปิดฝาให้สนิทแช่ในตู้เย็น 4°C รอการนำส่ง (ให้เจาะและดูดน้ำในตุ่มแผลหลายๆแผลรวมกันในหลอดเดียว เพื่อให้มีปริมาณมากพอสำหรับการแยกเชื้อ)

Swab จากตุ่มแผล ให้ทำความสะอาดตุ่มแผลด้วย 70 % แอลกอฮอล์ ใช้กรรไกรตัดผิวหนังที่คลุมตุ่มแผล จากนั้นใช้ใบมีดแลนเซต (lancet) ปราศจากเชื้อขูดแผลจนกระทั่งผิวหนังชั้นแต่เลือดยังไม่ออก แล้วใช้ไม้ swab ปราศจากเชื้อป้ายที่แผล แล้วรีบแช่ swab ลงในหลอด viral transport media (VTM) ปริมาตร 1-2 มล. หรือ ใส่ในหลอดปราศจากเชื้อ หักด้าม swab ทิ้งเพื่อปิดหลอดให้สนิท เก็บในกระติกน้ำแข็ง (4°C) ทันที ควรป้าย 2 ตำแหน่งหรือ 2 swab แล้วจุ่มลงในหลอด VTM เดียวกัน เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในหลอดตัวอย่าง

Throat swab เก็บในกรณีผู้ป่วยอาจมีแผลหรือตุ่มพองในกระพุ้งแก้ม หรือเก็บในผู้สัมผัสใกล้ชิดกับผู้ป่วย ยืนยันแต่ยังไม่แสดงอาการ ใช้ swab ป้ายภายในบริเวณ posterior pharynx จุ่มปลาย swab ลงในหลอด viral transport media (VTM) หักด้าม swab ทิ้งเพื่อปิดหลอดให้สนิท

ข้อควรระวังสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรม

1. ไม่ควรใช้ swab ที่มี calcium alginate หรือ swab ที่ด้ามทำด้วยไม้เพราะอาจมีสารที่ยับยั้งไวรัสบางชนิด หรือยับยั้งปฏิกิริยา PCR ควรใช้ Dacron หรือ Rayon swab ที่ด้ามทำด้วยลวดหรือพลาสติก

2. ตัวอย่างอื่นๆ อาจเก็บ urine, semen, rectal หรือ genital swab เมื่อพบแผลหรือตุ่มพองในตำแหน่งดังกล่าว ส่วน EDTA blood อาจตรวจพบเชื้อได้ในระยะ viremia แต่มักพบในช่วงสั้นๆก่อนที่ผู้ป่วยจะเกิดแผลหรือตุ่มพองและพบจำนวนไวรัสได้น้อยกว่าน้ำหรือหนองในตุ่มแผล

3. กรณีที่ตุ่มแผลแห้ง ตกสะเก็ด ให้เก็บสะเก็ดแผล (crusted scabs) ใส่หลอดปราศจากเชื้อ

4. เลือกใช้ชุดสกัด DNA extraction kit ที่เหมาะสมกับตัวอย่าง โดยเฉพาะสะเก็ดแผล ต้องผ่านกระบวนการบดหรือปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนใช้ชุดสกัด tissue extraction kit หรือชุดสกัดที่เหมาะสม

5. หากไม่พบสารพันธุกรรมของ MPXV ควรตรวจหาไวรัสชนิดอื่นที่ก่อให้เกิดแผลตุ่มพองลักษณะคล้ายคลึงกัน เช่น Varicella zoster virus และ Herpes virus หากแต่ไวรัสทั้ง 2 ชนิดมักจะไม่มีตุ่มแผลที่ฝ่ามือเหมือน MPXV

การเก็บรักษาและนำส่งสิ่งส่งตรวจ

ตัวอย่างสารคัดหลั่งและ swab จากตุ่มแผล ต้องแช่เย็น (2 ถึง 8°C) หรือแช่แข็ง (-20°C หรือต่ำกว่า) ภายใน 1 ชั่วโมง กรณีที่ไม่สามารถตรวจได้ภายใน 1 สัปดาห์ให้แช่แข็งที่ -70°C บรรจุและนำส่งตัวอย่างตามข้อกำหนด ตัวอย่างสารคัดหลั่งและ swab นำส่งตัวอย่างตามข้อกำหนด UN 3373, Category B ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้นำส่งตามข้อกำหนด UN 2814, Category A โดยบรรจุตัวอย่างตามวิธีการดังต่อไปนี้

1. ปิดฝาหลอดหรือภาชนะเก็บตัวอย่างส่งตรวจให้สนิทพันด้วยเทป ปิดฉลากแจ้งชื่อผู้ป่วย ชนิดตัวอย่าง วันที่เก็บ
2. นำหลอดหรือภาชนะสิ่งส่งตรวจ ห่อหุ้มด้วยวัสดุดูดซับก่อนใส่ถุงซิปลงและทำความสะอาดภายนอกด้วย 70 % แอลกอฮอล์
3. นำสิ่งส่งตรวจในถุงซิปลาสติก ใส่ในกระป๋องพลาสติกอย่างหนา (ชั้นที่ 2) มีฝาปิดสนิท ไม่รั่วซึม สามารถทนแรงกระแทกได้หากตกถึงพื้น
4. นำกระป๋องใส่ลงในกระติกเก็บความเย็นหรือกล่องโฟม (ชั้นที่ 3) ที่มีคุณสมบัติทนทานต่อการกระแทกกระแทก ในกรณีที่ส่งตรวจหาเชื้อไวรัสควรรักษาอุณหภูมิที่ 4-8 °C ตลอดการขนส่ง โดยใส่ Ice pack หรือน้ำแข็งแห้งลงในช่องว่างระหว่างชั้นที่ 2 และ 3 ให้เพียงพอและมั่นใจว่าจะรักษาความเย็นจนถึงปลายทาง
5. ปิดฝากล่องโฟม และใช้เทปพันปิดรอยต่อระหว่างฝาให้แน่น กรณีใส่น้ำแข็งแห้งใช้เทปยึดติดฝากล่องในลักษณะที่สามารถระบาย ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นได้ ระบุชื่อผู้ส่งและผู้รับตัวอย่าง พร้อมเบอร์โทรศัพท์ติดต่อกรณีฉุกเฉิน ที่ข้างกล่อง
6. ติดต่อบริษัทที่ให้บริการเพื่อรับตัวอย่าง จากนั้นประสานมายังห้องปฏิบัติการ แจ้งวัน เวลาที่ส่งตัวอย่างที่ ศูนย์ประสานงานการตรวจวิเคราะห์และเฝ้าระวังโรคทางห้องปฏิบัติการ (ศปส.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จ.นนทบุรี โทร 02 591 2153, 02 951 1485 หรือที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 15 แห่ง

หมายเหตุ : แบบนำส่งตัวอย่างให้ใส่ในซองพลาสติกกันน้ำก่อนส่ง

: Category A และ B มีความแตกต่างที่ระบบเอกสาร และบรรจุภัณฑ์ ซึ่งบรรจุภัณฑ์สำหรับ Category A ต้องได้รับการรับรองจาก United Nation (UN), วิธีการบรรจุตัวอย่างสำหรับ Category A และ B ปฏิบัติแบบเดียวกัน

การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี

เก็บซีรัมปริมาณ 0.5 – 1 มล. หรือเลือดประมาณ 3 – 5 มล. โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำประมาณ 3-5 มล. ใส่หลอดปราศจากเชื้อปิดฝาให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอเลือดแข็งตัว ปั่นแยกซีรัม แบ่งซีรัมใส่หลอดปราศจากเชื้อ เก็บเข้าตู้เย็น 4°C เพื่อรอการนำส่ง สำหรับผู้ป่วย เจาะเลือด 2 ครั้ง ครั้งแรกภายใน 1 สัปดาห์

เมื่อเริ่มมีอาการครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรกอย่างน้อย 21 วัน การตรวจหาแอนติบอดีอย่างเดียวไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้และการให้ผลบวก IgG จากซีรัมคู่อาจเกิดจากภูมิคุ้มกันเดิมที่ได้จากการฉีดวัคซีน

ชนิดตัวอย่างและการเก็บรักษาเพื่อการส่งตรวจ Monkeypox virus ทางห้องปฏิบัติการ

Specimen type	Collection material	Storage condition	Test	Note
Lesion: vesicles or pustules	Needle aspirate in sterile tube	2-8°C for less than 7 days -20°C or lower for longer storage	Real-time PCR	
Skin lesion: vesicles or ulcers	Dracon/Rayon swab with or without VTM (1 -2 ml)	Same as above	Real-time PCR	
Lesion: crusted or scrape	Sterile tube	Same as above	Real-time PCR	
Oropharynx/throat swab	Dracon/Rayon swab with or without VTM (1-2 ml)	Same as above	Real-time PCR	High risk contacts
Blood	EDTA blood 3 – 5 ml	Same as above	Real-time PCR	

เอกสารอ้างอิง

1. Monkeypox: diagnostic testing GOV.UK (<https://www.gov.uk/guidance/monkeypox-diagnostic-testing>)
2. Laboratory Guidelines for the Detection and Diagnosis of Monkeypox Virus Infection ,Pan American Health Organization (PAHO)
3. World Health Organization interim guidance on Laboratory testing for monkeypox virus, 23 May 2022
4. Laboratory Procedures | Monkeypox | Poxvirus | CDC, (<https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/lab-personnel/lab-procedures.htm>)