วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง
การตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจเพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วย Allplex™2019-nCoV Assay โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

จัดเตรียมเอกสารโดย	ตรวจสอบเอกสารโดย	อนุมัติใช้เอกสารโดย
สิรฉัตร		
(ทนพญ.สิรฉัตร วรวัฒนธรรม) นักเทคนิคการแพทย์	ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้ นักเทคนิคการแพทย์	(อ.พญ.สุกัญญา ชูคันหอม) รองผู้อำนวยการโรงพยาบาล ฝ่ายพัฒนาคุณภาพ
20 เม.ย. 2563	20 เม.ย. 2563	20 เม.ย. 2563

เลขที่เอกสาร	แก้ไขครั้งที่ : 00	สำเนาฉบับที่	วันที่เริ่มใช้
MSUH-WI-LAB-111	--/--/--		21 เมษายน 2563

1. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นคู่มือวิธีปฏิบัติงานของบุคคลากรที่ปฏิบัติงานหน่วยอณูชีวโมเลกุล สำหรับการตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจเพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ในผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วย Allplex™ 2019-nCoV Assay ให้เป็นมาตรฐานและถูกต้อง ประกอบการวินิจฉัยโรค ของงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. ขอบเขต

เอกสารฉบับนี้ใช้ที่หน่วยอณูชีวโมเลกุล งานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3. หลักการ

น้ำยาตรวจ PCR for novel Coronavirus (2019 nCoV) ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรค COVID 19 ด้วยวิธี Reverse transcription real-time PCR โดยตรวจหายีนที่จำเพาะต่อ SARS-CoV-2 ในส่วน E gene, N gene, RdRP gene และมี Internal control ที่ควบคุมคุณภาพตั้งแต่กระบวนการสกัดสารพันธุกรรม

4. คำจำกัดความ

2019 nCoV หมายถึง ไวรัสโคโรนา สายพันธุ์ใหม่ ปี 2019 (SARS-CoV-2) ที่ก่อโรค COVID-19

PPE หมายถึง อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล (personal protective equipment) ที่ได้รับการจัดเตรียมเป็นชุด โดยหน่วยควบคุมโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลสุทธาเวช

กล่องรับตัวอย่าง หมายถึง กล่องกระดาษหรือกล่องโฟม ติดป้าย biohazard ภายในมีที่บรรจุแพ็คน้ำแข็งแช่เย็นและมีกระป๋องพลาสติกกันกระแทกสำหรับบรรจุหลอดตัวอย่าง

ห้องรับส่งตัวอย่าง หมายถึง ห้องรับส่งตัวอย่าง งานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสุทธาเวช

หน้ากากป้องกันอนุภาค หมายถึง หน้ากากชนิด N95 ที่ได้รับจากหน่วยควบคุมโรคติดเชื้อโรงพยาบาลสุทธาเวช

เจ้าหน้าที่รับส่งตัวอย่าง หมายถึง เจ้าหน้าที่ งานเทคนิคการแพทย์ จัดตารางปฏิบัติงาน มอบหมายให้เป็นผู้ดำเนินการ รับตัวอย่าง (COVID-19) จากหอผู้ป่วย มาส่งที่ ช่องรับตัวอย่าง (pass box) หน่วยอณูชีวโมเลกุลวินิจฉัย และ/หรือ นำส่งตรวจต่อที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7

Positive หมายถึง พบสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ทั้ง 3 gene ในตัวอย่างผู้ป่วย ซึ่งไม่ได้บ่งบอกถึงความรุนแรงของการเกิดโรค หรือปริมาณของเชื้อ

Negative หมายถึง ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อทั้ง 3 gene ในตัวอย่างนั้น ๆ ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าผู้ป่วยไม่ติดเชื้อนี้ ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง ชนิดของตัวอย่าง คุณภาพของตัวอย่าง เป็นต้น

Inconclusive result หมายถึง มีการตรวจพบ gene ของเชื้อ ไม่ครบทั้ง 3 ชนิด ทำให้ไม่สามารถสรุปผลได้ แนะนำให้ทำการตรวจใหม่โดยเพิ่มปริมาณตัวอย่างและควรส่งตรวจวิธีอื่นร่วมด้วย เช่น การเพาะเชื้อ หรือ sequencing

5. สิ่งส่งตรวจและการจัดเก็บ

5.1. ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ใช้ ได้แก่ Nasopharyngeal swab และ Throat swab ใน UTM/VTM หลอดเดียวกัน , Bronchoalveolar lavage, Nasopharyngeal aspirate , sputum

5.2. ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจต้องอยู่ในสภาพแช่เย็น อยู่ในภาชนะบรรจุที่ปลอดภัย ตามมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

5.3. ตัวอย่างที่แบ่งเก็บและสารพันธุกรรมที่เหลือ จะเก็บไว้ยืนยัน 1 ปี ที่ตู้แช่ -20°C

5.4. ตัวอย่างที่เหลือจากการสกัดสารพันธุกรรมและเหลือจากการแบ่งเก็บแล้ว จะต้องทำการทิ้งลงในขยะติดเชื้อ เพื่อทำการ autoclave และทิ้งต่อไป

6. น้ำยา/วัสดุอุปกรณ์

6.1. เครื่องมือ ประกอบด้วย ดังนี้

6.1.1. เครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ magLEAD12gc (PSS)

6.1.2. เครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 (Bio-Rad)

6.1.3. PCR box สำหรับเตรียมน้ำยา master mix และ เติมตัวอย่าง

6.1.4. Biosafety cabinet class 2

6.2. น้ำยาต่าง ๆ เป็นแบบพร้อมใช้ ประกอบด้วย

6.2.1. ชุดน้ำยาตรวจ Allplex 2019-nCoV Assay (REF. RP102443X)

6.2.2. ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม MagDEA DxSV

7. ขั้นตอนการปฏิบัติ

7.1. การเตรียมน้ำยา PCR (master mix) ขั้นตอนนี้ต้องทำในห้อง PCR set up room โดยคำนวณจาก จำนวนตัวอย่าง + 1NC + 1PC โดย 1 reaction ดังนี้

7.2. ใส่เสื้อกาวน์สำหรับห้อง Set up room เท่านั้น

7.3. เตรียม cooling box เพื่อใส่น้ำยาตรวจที่ละลายแล้ว

7.4. ก่อนดูดน้ำยาต้องทำการ mixed & spin down ทุกครั้งที่ละลายน้ำยา

7.5. ดูด 2019-nCoV MOM 5 uL

7.6. ดูด RNase-free water 5 uL

7.7. ดูด 5x Real-time One-step Buffer 5 uL

7.8. ดูด Real-time One-step Enzyme 2 uL

7.9. mixed & spin down

7.10. ส่งหลอดน้ำยา Master mix ผ่านช่องกระจก ไปที่ห้อง detection โดยวางไว้ใน cooling box

7.11. บันทึกจำนวน reaction ในแบบฟอร์มการใช้น้ำยา PCR (FM-CL-06-002-00)

7.12. การเตรียมตัวอย่างสำหรับเข้าเครื่อง PCR ตามคู่มือการใช้งานเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 (Bio-Rad) โดยสังเขป ดังนี้

7.13. เตรียมหลอดทดสอบ Biorad tube ใน cooling box

7.14. แบ่งน้ำยา master mix ใส่หลอดละ 17 uL

7.15. เติม ตัวอย่างสารพันธุกรรม/NC/PC ลงใน PCR tube หลอดละ 8 uL

7.16. Spin down จากนั้นนำเข้าเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 (Bio-Rad)

7.17. เปิดโปรแกรม Bio-Rad CFX Manager เลือก “Create New Experiment CFX96” กด OK หรือเลือกเปิด “Experiment Setup” จากไอคอน

7.18. ใช้ protocol: Allplex_2019 nCoV.prcl เลือก plate Allplex_2019 nCoV.pltd Condition ที่ใช้ให้ตั้งค่า ดังนี้

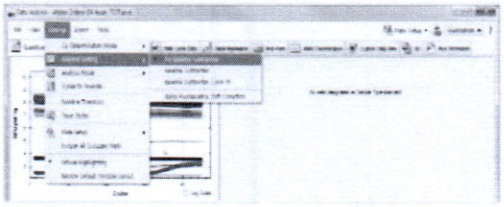
Step	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50℃	20 min
2	1	95℃	15 min
3	45	94℃	15 sec
4*		58℃	30 sec
5	GOTO Step 3, 44 more times		

*Plate read at step 4. Fluorescence is detected at 58°C.

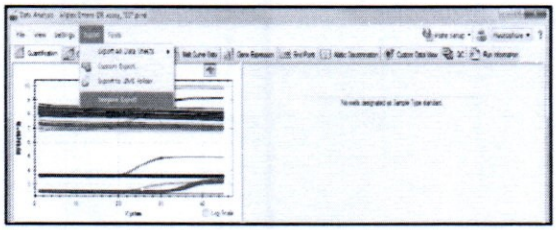
7.19. Start run ใช้เวลา ประมาณ 2 ชั่วโมง ซึ่งช่วงที่รอ สามารถแก้ไข เพิ่มเติมข้อมูลและหมายเลขทดสอบได้ ลงทะเบียนหมายเลขตัวอย่างและตำแหน่งที่วางหลอดทดสอบในเครื่อง PCR ในแบบฟอร์มบันทึกการลงตัวอย่าง PCR (FM-CL-06-006-00)

7.20. การวิเคราะห์ผลการทดสอบ (Data analysis) หลังจากทดสอบเสร็จสิ้นแล้ว จะปรากฏหน้าต่าง Data analysis

7.20.1. ให้เลือก Setting ->Analysis Mode ->No baseline subtraction



7.20.2. ทำการ Export โดยไปที่ Tool ->Seegene export -> เลือก folder ที่ D:\labresult\routine2020\Allplex



7.20.3. เปิดโปรแกรม Seegene Viewer for 2019-nCoV Allplex

7.20.4. File->Open-> D:\labresult\routine2020\Allplex\QuanStep4

7.20.5. เลือก product: Allplex 2019_nCoV Assay-> Apply

7.20.6. จะได้ผลเป็น auto-interpretation

7.20.7. เลือก print .

7.21. การแปลผลการตรวจ

7.21.1. **Positive control (PC)** ต้องให้ผลบวกทุก gene (E, N, RdRP and IC)

7.21.2. **Negative control (NC)** ต้องให้ผลลบทุก gene (E, N, RdRP and IC)

7.21.3. ตัวอย่างทดสอบ ต้องให้ผลบวก IC gene ผลการตรวจที่ valid Ct value of IC ≤40 ถ้าไม่ได้ ต้องทำการทดสอบใหม่

8. การรายงานผลการตรวจ

8.10. กรณีที่ให้ผลลบ จะลงผลว่า Negative ในระบบ Hos XP โรงพยาบาล และ review ผล โดยนักเทคนิคการแพทย์คนที่สอง และแจ้งหัวหน้างานเทคนิคการแพทย์เพื่อแจ้งทีมรักษาพยาบาลต่อไป

8.11. กรณีให้ผลบวกทั้ง 3 gene จะโทรศัพท์รายงานผลเบื้องต้นกับหัวหน้างานเทคนิคการแพทย์ เพื่อแจ้งทีมรักษาพยาบาลเบื้องต้น และลงผลในระบบ Hos XP ว่า Positive และ review ผล โดยนักเทคนิคการแพทย์คนที่สอง

8.12. กรณี Inconclusive ให้ดำเนินการ ทดสอบซ้ำตั้งแต่กระบวนการสกัดสารพันธุกรรม ถ้าได้ผลเช่นเดิมให้ลงผลในระบบ Hos XP โรงพยาบาลว่า “Inconclusive” เพื่อรอผลยืนยันจากห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7

9. การควบคุมคุณภาพ

9.1. การทดสอบทุกครั้ง ต้องมีการทำ Negative control, Positive control และทำ Internal control โดยการเติม internal control reagent ลงในตัวอย่าง ก่อนการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อควบคุมคุณภาพการทดสอบตลอดกระบวนการ และป้องกันกรณีมีสารยับยั้งปฏิกริยาการทำ PCR

9.2. การทดสอบความชำนาญ การตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสโคโรนา 19 (SARS-CoV-2) ด้วยวิธี Real time RT-PCR ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

10. ช่วงค่าที่รายงาน

Detection limit 100 RNA copies/reaction (อ้างอิงจากเอกสารกำกับรายการตรวจ Allplex™ 2019-nCoV Assay ของบริษัท Seegene ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี)

11. ค่าวิกฤต

ผลการตรวจที่พบเชื้อ หรือ Positive ต้องดำเนินการแจ้งหัวหน้างานเทคนิคการแพทย์ เพื่อรายงานผู้เกี่ยวข้องตามแนวทางการรายงานผลโรคติดต่ออันตรายของกรมควบคุมโรค

12. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

12.1. ต้องสวม PPE ที่มีประสิทธิภาพขณะปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากตัวอย่างและจุลินทรีย์บางชนิดที่อาจปนเปื้อนตัวอย่างตรวจ เช่น HIV, HBsAg เป็นต้น

12.2. การปฏิบัติงานทุกครั้งต้องอยู่ภายใต้การกำกับของบุคลากรคนที่ 2 และมีการสื่อสารขั้นตอนกันและกันตลอดเวลา

12.3. ต้องมีกล่องอุปกรณ์ทำความสะอาด กรณีมีการหกหล่นของตัวอย่างขณะปฏิบัติงาน

12.4. ก่อนการปฏิบัติงาน ต้องห้ามบุคลากรผู้ไม่เกี่ยวข้องเข้า-ออกจากห้องเตรียมตัวอย่าง พร้อมติดป้ายว่า “กำลังปฏิบัติงานเชื้ออันตราย ห้ามเข้า”

13. เอกสารที่เกี่ยวข้อง / เอกสารอ้างอิง

13.1. คู่มือมาตรฐานความปลอดภัย ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2560

13.2. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus(2019-nCoV) in suspected human cases Interim guidance. WHO. 17 January 2020

13.3. คู่มือการตรวจวินิจฉัย โรคติดเชื้อไวรัสโคโรน่า 2019 (COVID-19) ทางห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

13.4. คำแนะนำการปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการ สำหรับสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยสงสัย COVID-19 เพื่อการรักษาในโรงพยาบาล. บุษกร สันติสุขลาภผล ศิริรัตน์ ลิกานนท์สกุล ดร.สุมนมาลย์ อุทยมกุล เครือข่ายเทคนิคการแพทย์เพื่อผู้ป่วยโรคติดต่ออันตราย ฉบับที่ 1 วันที่ 6 มีนาคม 2563