






วิธีปฏิบัติงาน  
เรื่อง

การเตรียมตัวอย่าง และการสกัดสารพันธุกรรมเพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ  
Corona virus 2019  
โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

จัดเตรียมเอกสารโดย	ตรวจสอบเอกสารโดย	อนุมัติใช้เอกสารโดย
 (ทนาย.สิริฉัตร วรวัฒน์ธรรม) นักเทคนิคการแพทย์ 20 เม.ย. 2563	 ทนาย.เบญจพร แก้วคำใต้ นักเทคนิคการแพทย์ 20 เม.ย. 2563	 (อ.พญ.สุกัญญา ชุคันหอม) รองผู้อำนวยการโรงพยาบาล ฝ่ายพัฒนาคุณภาพ ...../20 เม.ย. 2563.....

เลขที่เอกสาร	แก้ไขครั้งที่ : 00	สำเนาฉบับที่	วันที่เริ่มใช้
MSUH-WI-LAB-112	--/--/--		21 เมษายน 2563







โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง : การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วยเครื่อง magLEAD12gc	เอกสารเลขที่ MSUH-WI-LAB-112	หน้า 2 จาก 7
	แก้ไขครั้งที่ 00	วันที่เริ่มใช้ 22 เมษายน 2563
ผู้จัดทำ : ทนพญ.สิริฉัตร วรวัฒน์ธรรม	หน่วยงาน : งานเทคนิคการแพทย์	
ผู้ตรวจสอบ : ทนพญ. เบญจมาศ อรุณพาส ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์	ผู้อนุมัติ : ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้ ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์	

1. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นคู่มือวิธีปฏิบัติงานของบุคลากรที่ปฏิบัติงานหน่วยอณูชีวโมเลกุล สำหรับการเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรมเพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ในผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ให้เป็นมาตรฐานและถูกต้อง ประกอบการวินิจฉัยโรค ของงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสุทธาเวช

2. ขอบเขต

เอกสารฉบับนี้ใช้ที่หน่วยอณูชีวโมเลกุล งานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3. หลักการ

เตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรมสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วยเครื่อง magLEAD12gc และ ชุดน้ำยา Viral Nucleic acid Extraction Kit II (Geneaid) ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส จากสิ่งส่งตรวจ เช่น เสมหะ เลือดและสารน้ำต่างๆ ของร่างกาย เพื่อใช้สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ COVID19 ด้วยวิธี Reverse transcription real-time PCR

4. สิ่งส่งตรวจและการจัดเก็บ

- 4.1. ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ใช้ ได้แก่ Nasopharyngeal swab และ Throat swab ใน UTM/VTM หลอดเดียวกัน , Bronchoalveolar lavage, Nasopharyngeal aspirate , sputum
- 4.2. ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจต้องอยู่ในสภาพแช่เย็น อยู่ในภาชนะบรรจุที่ปลอดภัย ตามมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
- 4.3. ตัวอย่างที่แบ่งเก็บและสารพันธุกรรมที่เหลือ จะเก็บไว้เย็น 1 ปี ที่ตู้แช่  $-20^{\circ}\text{C}$



โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง : การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วยเครื่อง magLEAD12gc	เอกสารเลขที่ MSUH-WI-LAB-112	หน้า 3 จาก 7
	แก้ไขครั้งที่ 00	วันที่เริ่มใช้ 22 เมษายน 2563
ผู้จัดทำ : ทนพญ.สิริฉัตร วรวัฒน์ธรรม	หน่วยงาน : งานเทคนิคการแพทย์	
ผู้ตรวจสอบ : ทนพญ. เบญจมาศ อรุณพาส ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์	ผู้อนุมัติ : ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้ ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์	

4.4. ตัวอย่างที่เหลือจากการสกัดสารพันธุกรรมและเหลือจากการแบ่งเก็บแล้ว จะต้องทำการทิ้งลงใน  
ขยะติดเชื้อ เพื่อทำการ autoclave และทิ้งต่อไป

5. น้ำยา/วัสดุอุปกรณ์

- 5.1. เครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ magLEAD12gc (PSS)
- 5.2. PCR box สำหรับเตรียมน้ำยา master mix และ เต็มตัวอย่าง
- 5.3. Biosafety cabinet class 2
- 5.4. น้ำยาต่าง ๆ เป็นแบบพร้อมใช้ ประกอบด้วย
  - ชุดน้ำยาตรวจ Allplex 2019-nCoV Assay (REF. RP102443X)
  - ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม MagDEA DxSV
  - ชุดน้ำยา Viral Nucleic acid Extraction Kit II (Geneaid)

6. ขั้นตอนการปฏิบัติ

6.1. ขั้นตอนการทำ Pretreatment ตัวอย่างเสมหะ (sputum)

กรณีเสมหะมีลักษณะปกติ (ไม่เหนียวหรือข้นมากเกินไป)

1. เติม PBS หรือ NSS ลงในกระปุกเสมหะ ในอัตราส่วน 1:1(sample : PBS หรือ NSS) ผสมให้เข้ากัน
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (RT) เป็นเวลา 10 นาที
3. ดูดเสมหะที่ละลาย หายเหนียวแล้ว ปริมาตร 200 ul หรือ 400 ul ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube (PSS tube)
4. ใส่ PR-V IC 10 ul ลงในหลอดตัวอย่างในข้อที่ 3 ผสมให้เข้ากัน
5. นำไปสกัดสารพันธุกรรม





โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสarakam

วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง : การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วยเครื่อง magLEAD12gc	เอกสารเลขที่ MSUH-WI-LAB-112	หน้า 4 จาก 7
	แก้ไขครั้งที่ 00	วันที่เริ่มใช้ 22 เมษายน 2563
ผู้จัดทำ : ทนพญ.สิริฉัตร วรวัฒนธรรม	หน่วยงาน : งานเทคนิคการแพทย์	
ผู้ตรวจสอบ : ทนพญ. เบญจมาศ อรุณพาส ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์	ผู้อนุมัติ : ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้ ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์	

หมายเหตุ ในขั้นตอนที่ 4 สามารถใส่ RP-V IC ลงใน 1.5 ml sample tube (PSS tube) รอไว้ แล้วใส่ตัวอย่างเสมหะที่ละลายแล้วตามลงไปได้

กรณีเสมหะมีลักษณะหนืดหรือข้นมาก ๆ ไม่สามารถทำให้ละลายได้จากการละลายในอัตราส่วน 1:1 หรือหากกรณีที่ได้ผล Invalid จากการทำรอบแรก

1. เติมน้ำ PBS หรือ NSS ลงในกระปุกเสมหะ ในอัตราส่วน 1:2 (sample : PBS หรือ NSS) ผสมให้เข้ากัน
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (RT) เป็นเวลา 10 นาที
3. ดูดเสมหะที่ละลาย หายหนืดแล้ว ปริมาตร 200 ul หรือ 400 ul ใส่ลงใน 1.5 ml sample tube (PSS tube)
4. ใส่ PR-V IC 10 ul ลงในหลอดตัวอย่างในข้อที่ 3 ผสมให้เข้ากัน
5. นำไปสกัดสารพันธุกรรม
- 6.2. ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมโดยชุดน้ำยา Viral Nucleic acid Extraction Kit II (Geneaid)
  - 6.2.2. เติมน้ำ RP-V IC ปริมาตร 10 ul ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
  - 6.2.3. เติมน้ำตัวอย่างทดสอบปริมาตร 190 ul ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เล็กน้อย
  - 6.2.4. เติมน้ำ VB Lysis Buffer ปริมาตร 400 ul ผสมให้เข้ากันด้วย pipetting หรือ vortexing
  - 6.2.5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที (spin down)
  - 6.2.6. เติมน้ำ AD Buffer ปริมาตร 450 ul ผสมให้เข้ากันโดย inverting หรือ vortexing ห้าม centrifuge
  - 6.2.7. ดูด lysate ปริมาตร 600 ul ใส่ใน VB column
  - 6.2.8. Centrifuge 14,000-16,000 g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (RT) ทิ้งของเหลวที่ไหลผ่าน column และ ใส่ column กลับเข้าไป
  - 6.2.9. ดูด lysate ที่เหลือ ประมาณ 450 ul ใส่ใน VB column Centrifuge 14,000-16,000 g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (RT)
  - 6.2.10. ทิ้ง collection tube และ ใส่ column ใน collection tube อันใหม่





โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสarakam

วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง : การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วยเครื่อง magLEAD12gc	เอกสารเลขที่ MSUH-WI-LAB-112	หน้า 5 จาก 7
	แก้ไขครั้งที่ 00	วันที่เริ่มใช้ 22 เมษายน 2563
ผู้จัดทำ : ทนพญ.สิริฉัตร วรวิฒนธรรม	หน่วยงาน : งานเทคนิคการแพทย์	
ผู้ตรวจสอบ : ทนพญ. เบญจมาศ อรุณพาส ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์	ผู้อนุมัติ : ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้ ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์	

- 6.2.11. เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ul ลงใน VB column Centrifuge 14,000-16,000 g เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง (RT) ทั้งของเหลวที่ไหลผ่าน column และ ใส่ column กลับเข้าไป
- 6.2.12. เติม Wash Buffer ปริมาตร 600 ul ลงใน VB column Centrifuge 14,000-16,000 g เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง (RT) ทั้งของเหลวที่ไหลผ่าน column และ ใส่ column กลับเข้าไป
- 6.2.13. Centrifuge 14,000-16,000 g เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (RT) เพื่อปั่นแห้ง
- 6.2.14. ใส่ VB column ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่ เติม RNase-free Water ปริมาตร 50 ul ลงบริเวณส่วนกลางของ VB column ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (RT)
- 6.2.15. Centrifuge 14,000-16,000 g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (RT) และทิ้ง VB column
- 6.2.16. ได้สารพันธุกรรมที่อยู่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube
- 6.3. การสกัดสารพันธุกรรม ด้วยเครื่อง magLEAD12gc (ที่ผ่านการทำความสะอาดและเปิด UV ฆ่าเชื้อมาแล้ว 30 นาที) ตามขั้นตอน ในวิธีปฏิบัติงาน เรื่อง : การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรมเพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วยเครื่อง magLEAD12gc (MSUH-WI-LAB-112) ดังนี้
  - 6.3.1. ใส่ cartridge (MagDEA Dx SV) ตามจำนวนตัวอย่างที่มี ในช่องใส่ cartridge
  - 6.3.2. ใส่ Tip ลงในช่อง T1
  - 6.3.3. ใส่ตัวอย่างลงในช่อง S และหลอด elution ลงในช่อง E พร้อมกับเปิดเอาฝาที่ขย่ะติดเชื้อ
  - 6.3.4. ปิดฝาหน้าเครื่อง แล้วกด start
  - 6.3.5. เลือก protocol ที่ 2 (Other sample)
  - 6.3.6. เลือก elution volume 50 ul
  - 6.3.7. กด start เพื่อเริ่มทำงาน ใช้เวลาประมาณ 30 นาที
  - 6.3.8. เมื่อเครื่องเสร็จสิ้นการทำงาน เปิดฝาเครื่องและนำฝาเกลียวไปปิดหลอด elution tube เพื่อนำไปทดสอบต่อไป



โรงพยาบาลสุทราเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง : การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วยเครื่อง magLEAD12gc	เอกสารเลขที่ MSUH-WI-LAB-112	หน้า 6 จาก 7
	แก้ไขครั้งที่ 00	วันที่เริ่มใช้ 22 เมษายน 2563
ผู้จัดทำ : ทนพญ.สิริฉัตร วรวัฒนธรรม	หน่วยงาน : งานเทคนิคการแพทย์	
ผู้ตรวจสอบ : ทนพญ. เบญจมาศ อรุณพาส ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์	ผู้อนุมัติ : ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้ ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์	

6.3.9. นำขยะที่เหลือทิ้งลงขยะติดเชื้อ

6.3.10. ทำการฆ่าเชื้อในตู้โดยการเปิด UV 30 นาที

## 7. การรายงานผล

-

## 8. การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

8.1. การควบคุมคุณภาพได้รับการทดสอบตามมาตรฐานของ Geneaid's ISO certified quality management system ตาม Lot โดยการแยกสารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่าง

## 9. ค่าอ้างอิง

-

## 10. ข้อเสนอแนะ

10.1. เมื่อเปิดน้ำยากล่องใหม่ ก่อนใช้งานให้เติม Absolute ethanol ลงใน AD Buffer และ Wash Buffer ตามปริมาณที่กำหนดข้างขวด

10.2. เพื่อให้การย่อยสลายสมบูรณ์ ขั้นตอนของการผสมตัวอย่างกับ VB Buffer มีความสำคัญ

10.3. Ethanol ที่หลงเหลืออยู่อาจส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม RNase-free water ในขั้นตอนการปั่นแห้งควรระมัดระวัง เพื่อกำจัด wash buffer ที่หลงเหลืออยู่

10.4. RNA ที่สกัดแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่อทันทีและเก็บที่ -20°C สำหรับการเก็บระยะยาว





โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง : การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Corona virus 2019 (COVID19) ด้วยเครื่อง magLEAD12gc	เอกสารเลขที่ MSUH-WI-LAB-112	หน้า 7 จาก 7
	แก้ไขครั้งที่ 00	วันที่เริ่มใช้ 22 เมษายน 2563
ผู้จัดทำ : ทนพญ.สิริฉัตร วรวัฒน์ธรรม	หน่วยงาน : งานเทคนิคการแพทย์	
ผู้ตรวจสอบ : ทนพญ. เบญจมาศ อรุณพาส ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์	ผู้อนุมัติ : ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้ ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์	

11. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

- 11.1. ต้องสวม PPE ที่มีประสิทธิภาพขณะปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากตัวอย่างและจุลินทรีย์บางชนิดที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่าง
- 11.2. การปฏิบัติงานทุกครั้งต้องอยู่ภายใต้การกำกับของบุคลากรคนที่2 และมีการสื่อสารขั้นตอนกันและกันตลอดเวลา
- 11.3. ต้องมีอุปกรณ์ทำความสะอาด กรณีมีการหกหล่นของตัวอย่างขณะปฏิบัติงาน
- 11.4. ก่อนการปฏิบัติงาน ต้องห้ามบุคลากรผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องเข้า-ออกห้องเตรียมตัวอย่าง พร้อมติดป้ายว่า "กำลังปฏิบัติงานเชื้ออันตราย ห้ามเข้า"

12. เอกสารอ้างอิง (References)

- 12.1. คู่มือมาตรฐานความปลอดภัย ห้องปฏิบัติการการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2560
- 12.2. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases Interim guidance. WHO. 17 January 2020
- 12.3. คู่มือการตรวจวินิจฉัย โรคติดเชื้อโคโรนา 2019 (COVID 2019) ทางห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- 12.4. คำแนะนำการปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการ สำหรับสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยสงสัย COVID 19 เพื่อการรักษาในโรงพยาบาล. บุษกร สันติสุขลาภผล ศิริรัตน์ ลิกานนท์สกุล ดร.สุมลมาลย์ อุทัยมกุล เครือข่ายเทคนิคการแพทย์เพื่อผู้ป่วยโรคติดต่ออันตราย ฉบับที่ 1 วันที่ 6 มีนาคม 2563
- 12.5. Viral Nucleic acid Extraction Kit II Protocol (Geneaid). 21 April 2020