



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

Pitfall ในการตรวจ SARS-CoV-2

ถ้วยเทคนิค Real-time RT-PCR



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

Pitfall ในการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

คณะกรรมการจัดทำแนวทางและข้อแนะนำภาคปฏิบัติ
การตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR
ภายใต้คณะกรรมการกึ่งด้านการจัดการห้องปฏิบัติการ (แล็บ)
กระทรวงสาธารณสุข

Real-time PCR

ข้อมูลทางบรรณานุกรมของสำนักหอสมุดแห่งชาติ

National Library of Thailand Cataloging in Publication Data

Pitfall ในการตรวจ SARS-CoV-Z ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR.-- นนทบุรี : กองแผนงานและวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2563.

28 หน้า.

1. โควิด-19 (โรค). 2. โควิด-19 (โรค) -- การตรวจทางการแพทย์. I. ชื่อเรื่อง.

616.2414

ISBN 978-616-11-4482-1

พิมพ์ครั้งที่ 1

ตุลาคม 2563

จำนวนพิมพ์

1,000 เล่ม

บรรณาธิการ

ดร.นวลจันทร์ วิจิษฐ์จินดา

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

กองแผนงานและวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000

<http://www.dmsc.moph.go.th>

โทรศัพท์ 0 2951 0000 โทรสาร 0 2951 1021

พิมพ์ที่

บริษัท ศูนย์การพิมพ์แก่นจันทร์ จำกัด

88/5 วัฒนานิเวศน์ ซ. 5 ถนนสุทธิสารวินิจฉัย

แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กทม.10310

โทรศัพท์ 0-2276-6545, 0-2276-6713, 0-2276-6721

โทรสาร 0-2277-8137

E-mail: k2536c@hotmail.com

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	4
Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)	5
ศัพท์จำเพาะ (terminology) เกี่ยวกับ real-time PCR	8
การตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR	9
ข้อมูลความรู้	9
ชุดน้ำยา (reagent kit)	11
คุณภาพและประสิทธิภาพการตรวจ	16
สาเหตุของผลลบปลอมที่พบได้บ่อย	22
สาเหตุของผลบวกปลอมที่พบได้บ่อย	22
ข้อควรปฏิบัติเมื่อพบปัญหาการปนเปื้อน (contamination)	23

บทนำ

การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus disease 2019; COVID-19) จากเชื้อ severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ที่รวดเร็วมีผู้ติดเชื้อจำนวนมากกว่า 30 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจำนวนมาก 1 ล้านราย (ณ วันที่ 28 กันยายน 2563) เป็นปัญหาสำคัญส่งผลกระทบต่อทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อระบบสาธารณสุข เศรษฐกิจ และสังคมของเกือบทุกประเทศทั่วโลก การพัฒนาวัคซีนในการป้องกันโรคและยาต้านไวรัสอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาให้สามารถนำออกมาใช้กับประชากรหมู่มาก การกักกันผู้สงสัยติดเชื้อ (person under investigate; PUI) หรือผู้สัมผัสโรคเป็นระยะเวลานาน 2 สัปดาห์มีค่าใช้จ่ายสูง และเป็นอุปสรรคต่อการบริหารจัดการทางการแพทย์และการดำเนินวิถีชีวิต การตรวจหา SARS-CoV-2 ในผู้ติดเชื้อเพื่อการวินิจฉัยโรค หรือการค้นหาผู้สัมผัสโรคที่ยังไม่แสดงอาการ เป็นหนึ่งในมาตรการสำคัญเพื่อการควบคุม-ป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่เชื้อกระจาย การตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 โดยตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) เป็นวิธีการที่แนะนำให้ใช้โดยองค์การอนามัยโลก และหน่วยงานหลักด้านสาธารณสุขของเกือบทุกประเทศ

ประเทศไทยเริ่มมีผู้ป่วยรายแรกในเดือนมกราคม 2563 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ใช้ในเครือข่ายห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และโรงพยาบาลที่มีชุดเครื่องมือตรวจ และมีการขยายจำนวนห้องปฏิบัติการตรวจเป็นจำนวนมากกว่า 200 แห่งทั่วประเทศ นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจ commercial kit หลายยี่ห้อที่ผลิตจากบริษัทต่างๆทั่วโลก เทคนิคการตรวจ real-time PCR แม้จะมีการใช้งานในห้องปฏิบัติการวิจัย/อ้างอิงในสถาบันวิจัยและศูนย์การแพทย์ของประเทศไทย

มานานกว่า 20 ปี แต่ยังเป็นเรื่องค่อนข้างใหม่สำหรับห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล ในภาวะเร่งด่วนที่มีข้อจำกัดในการสื่อสาร อบรม ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์การตรวจจากผู้เชี่ยวชาญสู่ผู้ปฏิบัติ ประกอบกับ COVID-19 เป็นโรคอุบัติใหม่ มีองค์ความรู้เกี่ยวกับโรคที่ทยอยเผยแพร่ออกมาตามระยะเวลาที่ผ่านมา การเปลี่ยนแปลงของข้อมูลต่างๆนี้ บางส่วนมีผลกระทบต่อการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันยังไม่มี gold standard ของวิธีการตรวจการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วย real-time RT-PCR ทั้งในระดับประเทศ และระดับสากล

คู่มือนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสื่อสารองค์ความรู้ แนวทาง และข้อปฏิบัติเกี่ยวกับการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานตรวจทางห้องปฏิบัติการได้ทบทวนและรับทราบข้อมูล เพื่อนำไปเป็นแนวทางการตรวจที่มีคุณภาพโดยเน้นเรื่องการป้องกันการเกิดผลบวกปลอมและลบปลอม

Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real-time RT-PCR)

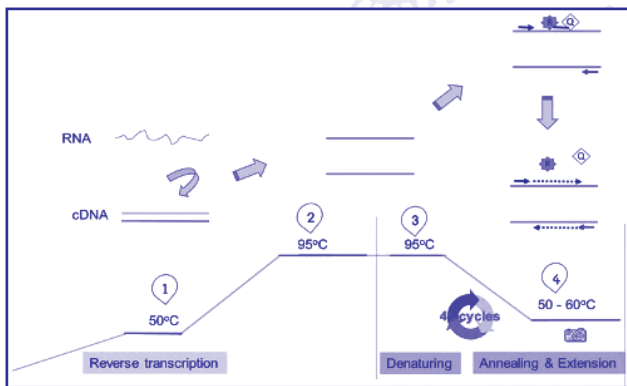
Real-time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ที่พัฒนาต่อจากเทคนิค PCR โดยตัดขั้นตอนการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจวัด PCR product ออก แล้วใช้การติดตามวัดสัญญาณเรืองแสงที่เกิดขึ้นขณะที่ DNA เป้าหมายเพิ่มจำนวนในทุกๆรอบตั้งแต่รอบแรกจนรอบสุดท้ายของการทำปฏิกิริยา (real-time detection) ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาแบบทวีคูณ (exponential amplification) ในลักษณะกราฟรูปตัว S (S-shape / sigmoid curve) วิธี real-time PCR ถูกใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรม

โดยการตรวจตัวอย่างเปรียบเทียบค่าความเข้มข้น DNA อ้างอิงที่ทราบปริมาณที่อัตรา
เจือจางต่างๆ (Standard curve) จึงเรียกว่า quantitative PCR (qPCR)

การวัดการเพิ่มจำนวนของ PCR product ในเทคนิค real-time PCR มีหลาย
วิธี แต่วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือการใช้ Hydrolysis probe (TaqMan probe) โดยในหลอด
ปฏิกิริยาที่มี DNA polymerase และสารจำเป็นในการเพิ่มปริมาณ PCR ในบัพเฟอร์
จะมีคู่ primer จำเพาะสำหรับ DNA เป้าหมาย และมี probe ซึ่งเป็น DNA สายสั้น
(10-20 bp) ที่มีสารเรืองแสง (Reporter) ที่ติดไว้ที่ปลาย 5' แต่จะถูกบังไว้ด้วยสารบังแสง
(Quencher) ที่ติดไว้ที่ปลาย 3' การเพิ่มจำนวนเริ่มจากขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95°C
เพื่อแยก DNA สายคู่ออกจากกันให้เป็นสายเดี่ยว (denaturing step) จากนั้นลดอุณหภูมิ
ลงมาที่ 50 – 60°C (annealing and extension step) ซึ่ง probe และ primers
จะเข้าจับกับ DNA เป้าหมาย เอนไซม์ DNA polymerase จะสร้าง DNA สายใหม่ต่อจาก
primer ไปจนชน probe ที่จับกับ target บนเส้น DNA เดียวกัน แล้วย่อย probe
ทำให้ reporter หลุดแยกออกมาและอยู่ห่าง quencher เครื่องจึงเห็นสัญญาณแสงจาก
reporter และบันทึกปริมาณแสงที่เกิดขึ้นไว้ทุกๆรอบ จนครบรอบการทำปฏิกิริยา (40-
45 รอบ)

กรณีการตรวจเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งมีสารพันธุกรรมชนิด RNA จะมีขั้นตอน
การเปลี่ยน RNA เป็น DNA (reverse transcription; RT) ก่อนการทำ real-time PCR
วิธีการตรวจจึงเป็น Real-time RT-PCR หรือ RT-qPCR ชุดน้ำยาตรวจปัจจุบันมีการ
ปรับปรุงให้ขั้นตอน RT และ PCR สามารถทำได้ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน (one-step
RT-PCR) รวมทั้งสามารถตรวจ DNA/gene ได้หลายเป้าหมายพร้อมกัน โดยการเลือก
reporter ที่ให้การเรืองแสงในช่วงความถี่คลื่นต่างกัน

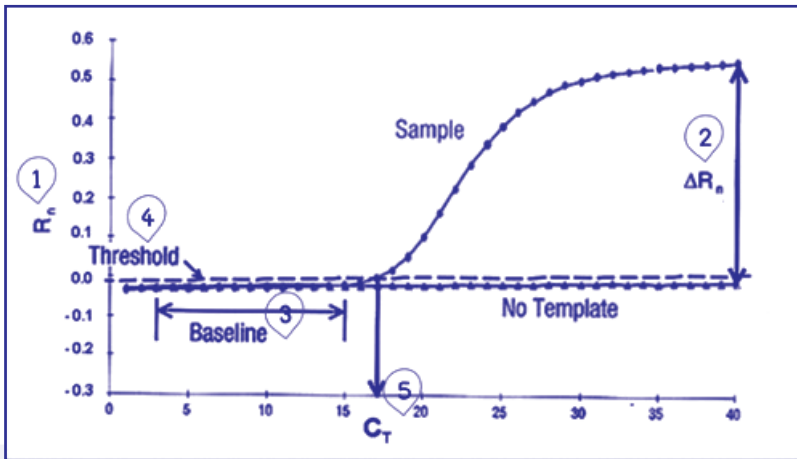
Real-time Reverse Transcription PCR (Real-time RT-PCR)



รูปที่ 1 Real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR)

1. Reverse transcription: การเปลี่ยน RNA เป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10-30 นาที
2. Inactivation and activation: การทำลายเอนไซม์ RT และกระตุ้นเอนไซม์ DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที
3. PCR: denaturing step: การแยก DNA เส้นคู่เป็นเส้นเดี่ยวที่ 95°C นาน 5-20 วินาที
4. PCR: annealing & extension step ที่อุณหภูมิ 50-60°C นาน 30-60 วินาที ทำซ้ำ step 3 และ 4 เป็นจำนวน 40-45 รอบ

หมายเหตุ: อุณหภูมิและช่วงเวลาของทุก step สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมกับ primer/probe และชุดน้ำยาที่ใช้ ซึ่งต้องมีการทดสอบและปรับแก้ (optimization) เพื่อให้ได้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม กรณีที่ตรวจ DNA เป้าหมายหลายตัวในหลอดเดียวกัน (multiplex) ต้องทำ optimization ให้ primer/probe ของแต่ละเป้าหมายให้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเดียวกัน



รูปที่ 2 กราฟแสดงการเพิ่มสัญญาณแสงของ reporter ที่เพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบการทำ PCR เป็นแบบทวีคูณ (exponential) มีลักษณะเป็น S-shape โดยตัวอย่างที่ไม่มี DNA เป้าหมาย (no template) จะไม่มีการเพิ่มสัญญาณแสง เห็นเป็นเส้นตรงแนวระนาบ

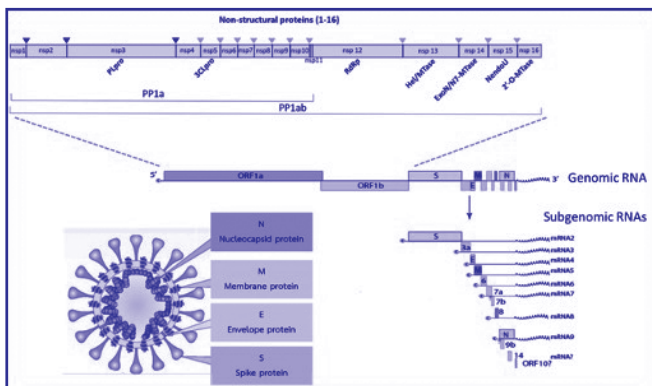
ศัพท์จำเพาะ (terminology) เกี่ยวกับ real-time PCR

1. Rn (Normalized reporter) หรือ FRU (Fluorescent reporter unit): เป็นค่าสัญญาณเรืองแสงของ reporter ที่หลุดเป็นอิสระจาก probe และสารดูดกลืนแสง (quencher) เกิดขึ้นขณะมีการเพิ่มจำนวนของ PCR product โดยบางเครื่องมือ/ชุดน้ำยาเป็นค่าที่หักลบการสารเรืองแสงอ้างอิง เช่น referent ROX dye
2. Delta Rn (ΔR_n): สัญญาณเรืองแสงของ reporter ที่วัดได้ในแต่ละรอบปฏิกิริยา หักลบค่าการแสงเรืองแสงระยะเริ่มต้นก่อนมีการเพิ่มจำนวน (baseline) [$\Delta R_n = R_n - \text{baseline}$]

3. Baseline: เป็น background ของสารเรืองแสงในหลอดปฏิกิริยาที่ตรวจวัดได้ในรอบแรกๆของการเพิ่มปริมาณ ก่อนที่จะมีการเพิ่มสัญญาณแสงแบบ exponential จากการเกิด PCR product
4. Threshold line: เส้นระดับของสัญญาณเรืองแสงที่สูงกว่าระดับ baseline และอยู่ในช่วงการเพิ่มจำนวนแบบ exponential growth ของ DNA เป้าหมาย ค่า threshold ขึ้นกับสารเรืองแสงที่ใช้เป็น reporter รวมทั้งองค์ประกอบต่างๆในการทำ real-time PCR สามารถให้เครื่องตั้งค่าแบบอัตโนมัติ หรือ ผู้ใช้สามารถปรับตั้งค่าเองได้ กรณีตรวจวัดหลายยีนเป้าหมาย ควรตั้งค่า threshold ของแต่ละ reporter ให้เหมาะสม
5. Ct (threshold cycle): จำนวนรอบที่สัญญาณแสงของตัวอย่างตัดกับเส้น Threshold ค่า Ct แปรผกผันกลับปริมาณ DNA เริ่มต้น ตัวอย่างที่มี DNA เป้าหมายเริ่มต้นมาก จะมีค่า Ct ต่ำ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA เป้าหมายน้อยกว่า จะมีค่า Ct สูง [Ct มีความหมายเดียวกับ quantification cycle; Cq]

การตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR: ข้อมูลความรู้

- ยีนของ SAR-CoV-2 ที่เป็นเป้าหมายในการตรวจ ที่ใช้กันได้แก่ non-structural (NS) เป็นยีนส่วนที่สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส เช่น RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) บางชุดทดสอบเรียกเป็น orf1a, orf1b, orf1ab, NS1, NS2, โดยไม่ได้ระบุว่าเป็นยีนทำหน้าที่อะไร หรือ อาจเป็น structural gene เช่น Nucleocapsid (N), Envelop (E) หรือ Spike (S) ขณะที่ไวรัสกำลังเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีการสร้างสารพันธุกรรมของไวรัส (genomic RNA) พร้อมกับสร้าง subgenomic mRNA เพื่อสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของไวรัสออกมาอย่างมากมาย โดยเฉพาะ Nucleocapsid



รูปที่ 3* โครงสร้างพันธุกรรม (genomic RNA) ของ SARS-CoV-2 แสดง open reading frame (ORF) polyprotein 1a (PP1a), polyprotein 1ab (PP1ab), และ 16 non-structural proteins (NSPs) รวมทั้ง subgenomic RNAs สำหรับสร้างโปรตีนโครงสร้างของไวรัส

*ดัดแปลงจาก Romano Cell 2020, 9(5),1267 (<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1267/htm>) และ ViralZone 2020 SIB Swiss Institute of Bioinformatics (<https://viralzone.expasy.org/8996>)

primer และ probe ถูกออกแบบให้จับกับบริเวณ conserved region ซึ่งหมายถึง บริเวณจำเพาะบนยีนที่มีลำดับเบสพบได้เฉพาะ SARS-CoV-2 แต่ไม่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น รวมทั้งไวรัส โดยเฉพาะไวรัสที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกัน เช่น SARS, MERS, หรือ coronavirus อื่นๆ หรือกลุ่มที่ก่อโรคในทางเดินหายใจเหมือนกัน ยีนเดียวกันอาจถูกเลือกช่วงลำดับเบสต่างบริเวณกันมาใช้เป็น primer/probe ขึ้นกับการวิเคราะห์และออกแบบของนักวิจัยหรือบริษัทผู้ผลิตชุดตรวจ ดังนั้นจึงไม่ได้หมายความว่าน้ำยาต่างยี่ห้อกันที่ใช้ยื่นเป้าหมายเดียวกันจะมีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) เท่ากัน การตรวจยืนยันเป้าหมายของไวรัส 2-3 ยีน พร้อมกับการตรวจ Internal control เรียกว่า multiplex RT-PCR สามารถทำได้โดยการใส่สารเรืองแสงต่างชนิดกันติดที่ probe ของแต่ละยีน

ชุดน้ำยา (reagent kit)

1. Buffer (อาจมีชื่อเรียกเป็น Premix, Supermix, Readymix ฯลฯ) มีส่วนผสมเป็นสารที่จำเป็นต้องใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA อยู่ใน buffer เพื่อควบคุม pH เช่น $MgCl_2$, KCl, dNTP และสารอื่นๆ (additive) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ เช่น gelatin, non-ionic detergent (tween-20, Tritonx-100), BSA และ สารอื่นๆ ตามสูตรเฉพาะของแต่ละบริษัทผู้ผลิตที่ไม่เปิดเผย บางชุดน้ำยาจะมีการผสมเอ็นไซม์ DNA polymerase enzyme และ/หรือ RT ลงไปด้วย ดังนั้นการชุดน้ำยาแต่ละยี่ห้อต้องใช้ Buffer ที่ให้มาควบคู่กับ Enzyme mix ของชุดน้ำยาเดียวกัน ห้ามใช้ข้ามยี่ห้อโดยเด็ดขาด ส่วนการใช้ข้ามชนิดชุดน้ำยา (catalogue number) ในยี่ห้อเดียวกันจะทำได้ก็ต่อเมื่อมีข้อมูลจากบริษัทผู้ผลิตว่าสามารถใช้ได้
2. Enzyme Mix เป็นหลอดที่มีส่วนผสมของเอ็นไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด ได้แก่ Reverse transcriptase และ RNase Inhibitor และอาจมี DNA polymerase สำหรับยี่ห้อที่ไม่ได้ใส่ไว้ใน buffer โดยมักผสมกันอยู่ใน glycerol ความเข้มข้น 20-50% เพื่อป้องกันการแข็งตัว (Freeze) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า $-20^{\circ}C$ และตอนนำมาใช้งานจะไม่เกิดการละลาย (thaw) การเกิด freeze-thaw ของ Enzyme mix บ่อยๆ ครั้งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้ประสิทธิภาพการตรวจลดลง
3. Option อื่นๆที่อาจมีในบางชุดน้ำยา
 - 3.1 RNase free water หรือ Nuclease free water หากไม่มีในชุดตรวจ ผู้ใช้ควรจัดหา molecular/PCR grade water เพื่อใช้งาน ไม่ควรใช้น้ำกลั่น หรือน้ำที่ผ่าน autoclave หรือน้ำบริสุทธิ์ที่ถูกเตรียมมาเพื่อใช้กับงานอื่น
 - 3.2 ตัวควบคุมบวก (positive control; PC) เป็นสารพันธุกรรมที่ให้ผลบวกกับยีนเป้าหมายของ SARS-CoV-2 เมื่อตรวจควบคุมไปกับตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อ

เพื่อตรวจสอบคุณภาพชุดนี้ว่ายังคงมีประสิทธิภาพ โดยมีทั้งแบบที่ต้องสกัดสารพันธุกรรมก่อน หรือเป็นสารพันธุกรรมที่ใช้เดิมในขั้นตอนการทำ real-time RT-PCR โดย PC ที่ดีไม่ควรมีความเข้มข้นสูง (มีค่า Ct ต่ำ) เพื่อให้มีความไวต่อการตรวจพบความผิดปกติของการตรวจที่เกิดขึ้นแม้เพียงเล็กน้อย รวมทั้งเพื่อป้องกันการปนเปื้อนไปยังตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วย (Cross contamination) ในขั้นตอนการสกัด หรือ หรือการเติมลงในหลอดปฏิกิริยา แล้วทำให้ตัวอย่างเกิดผลบวกปลอม ควรใช้ PC ที่มีความเข้มข้นต่ำ (ค่า Ct สูง)

ห้องปฏิบัติการอ้างอิงที่ใช้ชุดตรวจ in-house มักใช้ PC ที่เป็น viral culture supernatant เจือจางใน VTM โดยอาจเป็น VTM ที่มีเซลล์มนุษย์ปนอยู่ เช่น nasal swab จากคนปกติที่ไม่ติดเชื้อ เมื่อสกัดสารพันธุกรรมจะได้ RNA ของไวรัสและมนุษย์รวมกัน เพื่อใช้ housekeeping gene เป็น internal control ในกรณีชุด commercial kit ตัวอย่าง PC อาจเป็น plasmid control (สามารถสร้างให้มีหลายยีนเป้าหมายอยู่ใน plasmid เดียวกัน) หรือ DNA/RNA สังเคราะห์ (synthetic DNA/RNA) ตัวอย่าง PC แต่ละชนิดมีข้อดี ข้อเสีย รวมทั้งความคงตัว (Stability) ต่างกัน

positive control type	Pros	Cons
Viral culture supernatant ที่มี human cell เจือจาง ใน VTM	- เหมือนตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยมากที่สุด หลังสกัดสารพันธุกรรม จะได้ RNA รวม ของไวรัสและมนุษย์ ใช้ตรวจ target gene ของไวรัส ได้ทุกยีน และตรวจ housekeeping ยีนของมนุษย์ เพื่อการควบคุมคุณภาพการตรวจ ตั้งแต่ขั้นตอนสกัดจนถึงขั้นตอนการทำ RT-PCR	- ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อใน BSL-3 มีข้อจำกัดการผลิต ให้ได้จำนวนมาก - การใช้และการขนส่ง ต้องระวังตามมาตรฐาน Biosafety - ต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า -20°C - ไม่คงตัวต่อการ freeze-thaw หลายรอบ ต้องแบ่งเก็บ ในปริมาณเหมาะสมต่อการใช้งาน
Plasmid ที่สร้างให้มียีน เป้าหมายแทรกอยู่ (targeted gene – insert plasmid control) หรือ DNA สังเคราะห์	- ไม่ติดเชื้อ มีความคงตัวสูง - สามารถแทรกยีนหลายตัว เข้าใน plasmid เดียวกัน	- ตรวจได้เฉพาะยีน - ไม่สามารถบอกความบกพร่องในขั้นตอนการตรวจช่วง RT ได้
RNA สังเคราะห์	- ไม่ติดเชื้อ	- ความคงตัวต่ำ - ราคาแพง - ตรวจได้เฉพาะยีน

3.3 Internal control (IC) เป็นตัวควบคุมที่อยู่ในทุกหลอดปฏิกิริยา โดยมี primer/probe จำเพาะสำหรับการตรวจวัดอยู่ในส่วนผสมน้ำยา probe จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสงคนละสีกับ probe สำหรับยีนไวรัส โดยอาจเป็นชนิดที่บริษัทเตรียมขึ้นให้เพื่อเติมลงในทุกตัวอย่างก่อนการสกัด RNA (spiked IC) ตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้จะมี IC อยู่ปนกับ RNA ของเชื้อ บางบริษัทอาจใช้วิธีเติม IC ลงในการเตรียม master mix (exogenous IC) ก่อนแบ่งลงหลอดปฏิกิริยาและเติมตัวอย่าง RNA ซึ่ง IC ชนิดนี้จะไม่สามารถบอกความผิดพลาดของขั้นตอนการสกัดได้ ชุดตรวจบางยี่ห้อหรือชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง (in-house kit) ของหน่วยงานวิจัยหรือห้องปฏิบัติการอ้างอิงมักนิยมใช้ mRNA จากยีนมนุษย์ที่มีการแสดงออกอยู่ตลอดเวลา (housekeeping gene) เช่น RNase P, beta-actin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), peptidyl prolyl isomerase A (PPI), Phosphatase A2 (PLA) เป็น IC (endogenous IC) เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยโดยปกติจะได้เซลล์ของผู้ป่วยมาด้วย ในขั้นตอนการสกัด RNA จะได้ทั้ง viral RNA และ human mRNA ในการตรวจ SARS-CoV-2 จะมีการเติม primer/probe จำเพาะต่อ house-keeping gene ที่เลือกใช้

PCR TEST

Internal control (IC) Type	Pros	Cons
Endogenous IC Housekeeping gene	- ตรวจสอบคุณภาพการตรวจได้ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง, การสกัด RNA การเติมตัวอย่าง RNA จนถึงการทำ RT-qPCR	- อาจมีเชื้อที่สามารถติดต่อกับได้ ต้องปฏิบัติตามข้อกำหนด Biosafety
Exogenous IC DNA/RNA spike	- ไม่ติดเชื้อ - สังเคราะห์ได้	- ตรวจสอบได้แต่ขั้นตอนการทำ PCR RNA spike มีความคงตัวต่ำ
Spike IC	- ตรวจสอบขั้นตอนการสกัด RNA ว่ามีประสิทธิภาพหรือมีตัวยับยั้ง inhibitor ปนมาใน RNA ที่สกัดได้หรือไม่	- ไม่สามารถตรวจสอบขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

3.4 ระบบป้องกันการปนเปื้อนจาก PCR product ด้วย UNG โดยตั้งแต่เริ่มแรกของการตรวจ ใช้ส่วนผสม ที่มี dUTP ปนใน dNTP ของ master mix เมื่อทำ PCR จะได้ PCR product ที่มี dUTP ในการทำ real-time PCR ครั้งถัดไปในน้ำยาที่มีการเติม Uracil N Glycosylase (UNG/UDG) จะทำลาย PCR product ที่อาจปนเปื้อนในหลอดปฏิกิริยาโดยไม่ทำลาย RNA/DNA เป้าหมายที่สกัดได้

คุณภาพและประสิทธิภาพการตรวจ

คุณภาพและประสิทธิภาพการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR ขึ้นกับหลายปัจจัย มีคู่มือการตรวจ การตั้งห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน Biosafety การเก็บตัวอย่างตรวจ การตรวจและการควบคุมคุณภาพ หลายฉบับที่ให้ความรู้โดยละเอียดในเรื่องเหล่านี้ไว้ คู่มือฉบับนี้ให้แนวปฏิบัติเพื่อการป้องกันการเกิดผลบวกปลอมและลบปลอมในการตรวจ ดังนี้

1. การจัดห้องปฏิบัติการให้มีระบบการทำงานที่ป้องกันการเกิดการปนเปื้อน (contaminate) ระหว่างตัวอย่าง และจาก PCR product ที่เกิดขึ้นในการตรวจครั้งก่อนหน้าไปยังวัสดุ อุปกรณ์ และบริเวณห้องปฏิบัติการ ซึ่ง PCR product ที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กมาก (ประมาณ 100 bp) จากจำนวนเริ่มต้น 1 copy จะถูกเพิ่มเป็นหลายล้าน-ล้าน (10^{13}) copies จากการทำ PCR 40 รอบ การฟุ้งกระจายเพียงเล็กน้อยจากหลอดที่ให้ผลบวกสามารถปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ก่อให้เกิดผลบวกปลอม และกำจัดได้ยาก จึงจำเป็นต้องมีการป้องกันตั้งแต่แรก โดยปฏิบัติตามคู่มือจัดตั้งห้องปฏิบัติการตรวจทางอณูชีววิทยาคู่มือการจัดตั้งห้องปฏิบัติการ PCR (Establishment of PCR laboratory in developing countries, 2nd edition) ขององค์การอนามัยโลก และ มาตรฐานความปลอดภัย Biosafety อย่างเคร่งครัด

2. การเก็บตัวอย่างตรวจที่ได้คุณภาพจากคนไข้ ต้องมีขั้นตอนการเก็บที่ถูกต้อง รักษาสภาพไวรัสหรือเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือน้ำยารักษาสภาพตัวอย่างอื่นๆ ตามคำแนะนำของชุดตรวจ

3. การสกัดตัวอย่าง RNA ต้องเลือกใช้ชุดสกัดที่มีคุณภาพ สามารถสกัดสารตัวอย่างพันธุกรรม RNA ของไวรัสได้ในคุณภาพและปริมาณสูง กล่าวคือ ได้สาร RNA ปริมาณมาก และกำจัดสารปนเปื้อนที่อยู่ในตัวอย่าง โดยเฉพาะ inhibitor ซึ่งอาจเป็น RNase ที่ทำลาย

RNA หรือ สารที่ยับยั้งปฏิกิริยาการทำ RT-PCR ชุดสกัดแต่ละยี่ห้อ มีคุณสมบัติและประสิทธิภาพต่างกัน ควรเลือกใช้ชุดสกัดที่ผ่านการประเมินประสิทธิภาพแล้ว โดยทั่วไปชุดสกัดแต่ละยี่ห้อจะระบุว่าสามารถใช้กับตัวอย่างอะไร ปริมาตรเริ่มต้นเท่าไร และได้ตัวอย่าง RNA ในปริมาณเท่าไร การเปลี่ยนแปลงชนิดตัวอย่างจากคนไข้ รวมทั้งปริมาณของตัวอย่างและน้ำยาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพ RNA ที่สกัดได้ ควรปรึกษาผู้เชี่ยวชาญผลิตภัณฑ์หรือสอบถามจากผู้ที่มีประสบการณ์ใช้งาน การสกัด RNA ให้ทำตามคู่มือชุดสกัดอย่างเคร่งครัด โดยมีข้อปฏิบัติและข้อควรระวังเพิ่มดังนี้.

- ใช้ plastic wares ทุกชนิด เช่น 0.5/1.5 ml microcentrifuge tube, PCR tube/plate, filter tip ฯลฯ ที่มีการรับรองว่าปราศจากการปนเปื้อนของสารทำลาย RNA (RNase/DNase/Nuclease free certified) จากบริษัทผู้ผลิต ซึ่งสามารถใช้งานได้โดยไม่ต้องนำไป autoclave ก่อน ควรแบ่ง tube ออกจากถุงมาใส่กระป๋องพลาสติกสะอาดเพื่อใช้งาน แยกเก็บส่วนที่เหลือโดยปิดผนึกให้มิดชิด
- การสกัด RNA ตัวอย่างจำนวนมาก ต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง บวกจากคนไข้อย่างหนึ่งไปยังตัวอย่างอื่นๆ ในการเปิดภาชนะบรรจุ (unpack) ควรใช้สารที่สามารถกำจัดหรือทำลายไวรัสได้ เช่น 70% alcohol และซับตัวอย่างด้วยทิชชูที่ตัดเป็นแผ่นเล็กสำหรับแต่ละหลอดตัวอย่าง แล้วจึงทำความสะอาดถุงมือก่อนที่จะจับตัวอย่างถัดไป การเปลี่ยนถุงมือบ่อยๆ มีส่วนช่วยในการลด contamination สำหรับขั้นตอนที่มีการเติมน้ำยาและผสมด้วย vortex mixer ต้องปั่น spin down ให้สารละลายรวมกันที่ก้นหลอดก่อนเปิดฝาหลอดทุกครั้ง และเปิดฝาลอดด้วยความระมัดระวัง ไม่ควรเปิดหลอด microtube มือเดียวโดยใช้นิ้วหัวแม่มือดันฝาเพื่อเปิดหลอด ควรใช้สองมือ หรือใช้อุปกรณ์ช่วยเปิดหลอด Microtube เพื่อลดการสัมผัสผาด้านใน
- การสกัด RNA แบบ manual ด้วยวิธี spin column มีขั้นตอนการปั่นด้วยเครื่อง

centrifuge ทำให้เกิดโอกาสปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างหรือจากตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) ได้สูง โดยเฉพาะกรณีที่ใส่สารลงไปในห้องปฏิกิริยาจนล้น หรือปริมณอยู่ที่ขอบเมื่อปิดฝาหลอด ในตอนปั่นจะกระเด็นออกมาปนเปื้อนหลอดอื่นๆ และติดในโถปั่น (chamber) ของ centrifuge ควรเช็ดทำความสะอาดด้วย 0.5% hypochlorite แล้วเช็ดตามด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง

- การเก็บรักษาตัวอย่าง RNA ในสภาพเย็นระหว่างรอเติมลงในหลอดปฏิกิริยา เนื่องจาก RNase ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปตามผิวหนัง น้ำมูก น้ำลาย น้ำตา เหงื่อ ซึ่งไม่ทำงาน หรือทำงานได้น้อยในอุณหภูมิตำกรณีที่ยังไม่สามารถตรวจได้ทันทีหรือตรวจเสร็จแล้ว และต้องการเก็บเพื่อรอการตรวจซ้ำควรเก็บไว้ที่ -20°C หรือเก็บที่ -70°C สำหรับการเก็บระยะยาว

4. การเก็บรักษาชุดน้ำยา real-time RT-PCR ให้เก็บตามคำแนะนำในคู่มือชุดน้ำยา บางชุดน้ำยาแนะนำให้เก็บไว้ที่ $4-8^{\circ}\text{C}$ ได้ในระยะเวลา 2-4 สัปดาห์ โดยแยกเก็บ enzyme mix ไว้ที่ -20°C ในกรณีที่มีตัวอย่างไม่มากควรแบ่งน้ำยาออกปริมณน้อยๆ เพื่อป้องกันการเสื่อมของน้ำยาจากการ freeze-thaw หลายรอบ การโดนแสง หรือการ contaminate

5. ตู้เตรียมน้ำยา master mix ใช้ผสมและแบ่งน้ำยาเท่านั้น โดยต้องไม่นำตัวอย่างสารพันธุกรรมใด ๆ (DNA/RNA sample, positive control, negative control, plasmid, ฯลฯ) เข้ามาในตู้ ขณะเตรียม master mix ไม่ควรเปิดระบบหมุนเวียนอากาศ หรือให้มีลมมาจากเครื่องปรับอากาศเป่าเข้าสู่ตู้ ก่อนและหลังใช้งาน ควร spray และเช็ดด้วยน้ำยาที่ทำลาย DNA และ RNase เช่น RNaseAway® , DNAzap™ รวมทั้งเปิด UV เพื่อทำลาย DNA/PCR product หากมีการปนเปื้อน

การเตรียม master mix มีข้อปฏิบัติดังนี้

- หากเก็บน้ำยาแช่แข็ง ต้องตรวจสอบให้แน่ใจว่าน้ำยามีการละลายสมบูรณ์ เขย่าผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ที่ตั้งรอบการเขย่าเบาๆ ไม่ผสมโดยการดูด-เป่าด้วย autopipette แรงๆ หรือ เร็วๆ เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศ หรือการแตกทำลายของ primer/probe และปั่น spin down เบาๆ เพื่อไม่ให้มีสารเกาะติดฝาหลอดก่อนเปิดฝา
- ใช้ filter tip ในการดูดส่วนผสมต่างๆ โดยเลือกใช้ tip ชนิดที่มีความยาว เพื่อไม่ให้ส่วนของ autopipette จุ่มโดนภายในหลอด เทคนิคการดูดสารให้จุ่มเฉพาะส่วนปลาย tip ลงในหลอดให้ต่ำกว่าระดับผิวหน้าสารละลายเพียงเล็กน้อย แล้วเลื่อน tip ลงขณะดูดสาร ไม่ควรจุ่มลงไปก้นหลอด ดูดสารแต่ละชนิดเติมลงในหลอด master mix โดยกดปล่อยสารแล้วรู้สึกตึงมือแต่ไม่เป่าออก (blow out) และไม่ดูดขึ้น-ลงเพื่อผสมสาร ยกเว้น enzyme mix ซึ่งอยู่ใน glycerol ที่มีความหนืด ให้ดูดขึ้นลงซ้ำๆ อย่างน้อย 10 ครั้ง เพื่อผสมกับสารตัวอื่นๆ
- ดูดน้ำยาต่างๆตามปริมาตรที่คำนวณไว้ให้เพียงพอสำหรับตัวอย่างตรวจ โดยเผื่อสำหรับ positive control (PC), no template control (NTC) โดยควรดูด enzyme mix เป็นตัวสุดท้าย ขณะเตรียม master mix หากมีถาดเย็น (cool rack/box) เพื่อช่วยรักษาอุณหภูมิองค์ประกอบต่างๆของการทำ real-time qPCR จะช่วยให้การตรวจมีประสิทธิภาพ และช่วยลด non-specific amplification มีน้ำยาบางยี่ห้อที่ใช้เอ็นไซม์ที่ผ่านการตัดแต่งพันธุกรรม หรือ ใช้โครงสร้างทางเคมี หรือมีโปรตีน (antibody) จับส่วน active site ไว้ ทำให้ไม่ทำงานที่อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิห้อง ต้องมีการกระตุ้น (activate) ด้วยอุณหภูมิสูงก่อน เช่น เอ็นไซม์ warm start reverse transcriptase ใช้อุณหภูมิ 50°C หรือ hot start DNA polymerase ใช้อุณหภูมิ 94°C ชุดน้ำยาที่ใช้เอ็นไซม์ประเภทนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ cool rack/box ในขณะที่เตรียม master mix

- การเติมตัวอย่าง RNA ให้ทำในตู้แยก หรือบริเวณที่ไม่ใช่ตู้เตรียม master mix โดยเติมตัวอย่าง RNA จากผู้ป่วยก่อนให้ครบ จากนั้นเติมน้ำลงในหลอดที่เป็น no template control แล้วจึงเติม positive control เป็นอันดับสุดท้าย การเติมตัวอย่าง RNA ให้ใช้เทคนิคการดูด-ปล่อยลงที่กันหลอด PCR แบบไม่เป่า และไม่ต้องดูดขึ้น-ลงเพื่อผสมตัวอย่าง RNA กับน้ำยา เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศซึ่งรบกวนการเกิดปฏิกิริยาและการอ่านผลที่เป็นสาเหตุให้เกิดผลบวกปลอมหรือลบปลอม ปิดหลอด/เพลทให้สนิท เขย่าผสมด้วย vortex หรือการเคาะเบาๆ spin down เพื่อให้สารทั้งหมดตกลงสู่กันหลอดและไล่ฟองอากาศก่อนนำไปใส่เครื่อง real-time PCR

6. การอ่านผล real-time qPCR ควรปฏิบัติดังนี้

- ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของ IC ของทุกตัวอย่างว่ามีการเพิ่มจำนวนแบบ exponential ตัวอย่างที่ไม่มีการเพิ่มปริมาณ IC ถือว่าเป็นตัวอย่างที่ไม่มีคุณภาพ ต้องมีการสกัดตัวอย่างใหม่ หรือ เก็บตัวอย่างใหม่
- ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของ target genes ของไวรัสในตัวอย่าง PC ว่าค่า Ct อยู่ในช่วงกำหนดของชุดน้ำยา หรือมีค่าใกล้เคียงกับการตรวจในครั้งก่อนหน้า และมี amplification plot ที่เป็นรูป s-shape
- ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนโดยดู amplification plot ของ target genes ของไวรัสในตัวอย่าง RNA จากคนไข้ทุกราย
- การเกิด PCR product จนถึงระดับตรวจวัด ต้องมีลักษณะเป็น S-shape ในกรณีที่มีไวรัสต่ำมาก (ค่า Ct สูงมากกว่า 35) อาจเห็นลักษณะ S-shape ไม่ชัดเจน
- ตัวอย่างในบางหลุมปฏิกิริยาอาจลักษณะ amplification plot แปลกไปจากลักษณะ S-shape เช่นเป็นเส้นตรงเฉียงขึ้นไปเรื่อยๆจนผ่าน threshold line หรือเป็นเส้นตรงระนาบแต่มีการกระตุกบางช่วง อาจมีสาเหตุจากการปิดฝาหลอดหรือเพลทไม่สนิท

ทำให้เกิดการระเหยของน้ำ หรือ การมีฟองอากาศ หรือ probe เสื่อมสภาพ (degrade) การอ่านผลโดยอัตโนมัติด้วย software ของเครื่องจะได้ค่า Ct ซึ่งเป็นผลบวกปลอม สามารถตรวจสอบได้โดยการดูค่าการเรืองแสงของแต่ละชนิดแบบข้อมูลดิบที่ไม่มีการหักลบค่าเรืองแสงของน้ำยาหรือสารเรืองแสงอื่นในหลอด (multicomponent plot หรือ non-subtraction plot)

- กรณีที่พบกราฟเป็น S-shape แต่มีส่วน baseline ไม่เป็นเส้นตรง และโค้งตกลงมาใต้เส้น threshold line ทำให้เครื่องอ่านค่าเป็นผลลบ ซึ่งพบได้ในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสสูงมาก (ค่า Ct ต่ำกว่า 15) ให้ปรับช่วง baseline ของ amplification plot และกำหนด threshold line ใหม่ อาจทดสอบซ้ำโดยใช้ตัวอย่าง RNA ลดลง หรือ เจือจางตัวอย่าง RNA 100 เท่า ก่อนเติมลงใน master mix หากไม่แน่ใจ ให้ปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ เพื่อขอคำปรึกษาเป็นรายตัวอย่าง
- ค่า Ct ที่ตัดสินว่าตัวอย่างบวกหรือลบ ให้ยึดตามคู่มือชุดน้ำยา โดยทั่วไปใช้ค่า Ct < 35 และต้องบวกอย่างน้อย 2 viral target genes
- ตัวอย่างที่ค่า Ct > 35 ให้พิจารณาตรวจซ้ำ

7. PCR tube/plate ที่ผ่านการเข้าเครื่อง real-time PCR แล้วให้ทิ้งในถุงหรือภาชนะปิด และส่งเผาทำลาย (รวมทั้ง pipette tip ที่ใช้ดูดตัวอย่าง RNA และ positive control) ห้ามนำไป autoclave เพราะขณะ autoclave ความร้อนและความดันสูง อาจทำให้ฝาหลอดเปิด และทำให้ PCR product ในหลอดลุดฟุ้งกระจายสู่สิ่งแวดล้อม

สาเหตุของผลลบปลอมที่พบได้บ่อย

1. การเก็บตัวอย่างไม่ถูกต้อง ตัวอย่างมีการปนเปื้อนของสารทำลาย RNA
2. ขนส่งตัวอย่างและการเก็บรักษาไม่ถูกต้อง
3. สกัด RNA ไม่ได้ เนื่องจากคุณภาพชุดสกัด หรือมีการทำลาย RNA หลังสกัดจากการปนเปื้อนของ RNase
4. ชุดน้ำยาตรวจ real-time PCR เสื่อมสภาพ โดยเฉพาะ enzyme และ probe
5. เครื่อง real-time PCR ทำงานผิดปกติ
6. ตัวอย่างมีปริมาณไวรัสสูงมากเกินไปค่าการตรวจของวิธี
7. ตัวอย่างมีไวรัสในระดับต่ำมาก ทำให้การดูดตัวอย่าง RNA ไปเต็มในหลอดปฏิกิริยาได้บ้าง ไม่ได้บ้าง ผลการตรวจจะแกว่งเป็นบวก ปน ลบ ให้สกัด RNA ใหม่ โดยทำให้เข้มข้นขึ้น โดยเพิ่มปริมาณตัวอย่างก่อนสกัด หรือ ลดปริมาณ elution buffer ลง (ปฏิบัติตามคำแนะนำของคู่มือน้ำยา)
8. Human error จากการสลับตัวอย่าง ลืมเติมตัวอย่าง เติมตัวอย่างไม่ครบ

สาเหตุของผลบวกปลอมที่พบได้บ่อย

1. มีการปนเปื้อน (Contamination) จาก PCR product จากการทำในรอบก่อนหน้า หรือ positive control โดยเฉพาะชนิดที่เป็น plasmid
2. มีการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างบวก ในขั้นตอนการสกัด RNA หรือ การเติมตัวอย่าง RNA ลงใน master mix
3. Human error จากการสลับตัวอย่าง
4. การอ่านผลด้วยเครื่องมีความผิดปกติ

ข้อควรปฏิบัติเมื่อพบปัญหาการปนเปื้อน (contamination)

1. หยุดให้บริการวิเคราะห์
2. ทำความสะอาดห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และอุปกรณ์ทุกชิ้นอย่างละเอียดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ 0.5% Sodium hypochlorite เช็ดตามด้วยน้ำสะอาด และ 70% Alcohol ไม่ใช่ 70% Alcohol เพียงชนิดเดียวเนื่องจากไม่มีฤทธิ์ทำลาย DNA
3. ทบทวนวิธีปฏิบัติว่าถูกต้องตามหลักการ มีการรักษาทิศทางการทำงานแบบทิศทางเดียวจาก การเตรียมน้ำยา Master Mix การสกัดตัวอย่าง และการทำ PCR ไม่ใช่ อุปกรณ์ข้ามห้อง
4. ค้นหาจุดบกพร่องของเทคนิคทางห้องปฏิบัติการที่อาจเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนและแก้ไข
5. เปลี่ยนชุดน้ำยาตรวจทั้งหมด รวมทั้ง plastic ware ต่างๆ (tube, tip)
6. ทำการทดสอบ no template control (NTC) หลายๆหลอด และ positive control เมื่อไม่พบการปนเปื้อนแล้ว จึงเริ่มให้บริการตรวจวิเคราะห์ใหม่

หนังสือหรือเอกสารอ่านประกอบ

1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ทางห้องปฏิบัติการ <https://www3.dmsc.moph.go.th/post-view/700> accessed on 1 เมษายน 2563
2. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข คู่มือมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์และสาธารณสุข พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด ; 2560.
3. สำนักวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แนวปฏิบัติสำหรับการดำเนินการกับเชื้อ Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 วันที่ 20 มีนาคม 2563.
4. Regional Office for South-East Asia, World Health Organization. (2016). Establishment of PCR laboratory in developing countries, 2nd edition. WHO Regional Office for South-East Asia. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/249549>

PCR TEST

สำเนาฉบับ

คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ที่ ๑๐๖๗๙/๒๕๖๓

เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานจัดทำแนวทางและข้อแนะนำภาคปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เพื่อให้การดำเนินงานด้านการตรวจวินิจฉัยโรคโคโรนา 2019 (Coronavirus disease 2019: COVID-19) จากการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ด้วยวิธี RT-PCR ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีการดำเนินงานด้วยความเหมาะสม สอดคล้องกับมาตรฐานสากล และมีประสิทธิภาพ เพื่อรองรับสถานการณ์ระบาดที่มีผู้ติดเชื้อจำนวนมาก จึงเห็นควรให้มีคณะทำงานจัดทำแนวทางและข้อแนะนำภาคปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

อาศัยอำนาจตามคำสั่งมาตรา ๓๒ แห่งพระราชบัญญัติระเบียบบริหารราชการแผ่นดิน พ.ศ. ๒๕๓๔ และที่แก้ไขเพิ่มเติม อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงแต่งตั้งคณะทำงานจัดทำแนวทางและข้อแนะนำภาคปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดังนี้

ข้อ ๑ องค์ประกอบ

- | | |
|--|----------------|
| ๑.๑ นางนวลจันทร์ วิจิตรชัยจินดา | ประธานคณะทำงาน |
| นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญ
กองการแพทย์จีนไมกส์และสนับสนุนนวัตกรรม | |
| ๑.๒ นางพิไลลักษณ์ อัครไพฑูรย์ โอภาตะ | คณะทำงาน |
| นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
สถาบันวิทยาศาสตร์สาธารณสุข | |
| ๑.๓ นางสุมาลี ชะนะมา | คณะทำงาน |
| นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
สถาบันวิทยาศาสตร์สาธารณสุข | |
| ๑.๔ นางสาวนุสรา สัตย์เพชรพราย | คณะทำงาน |
| นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ
กองการแพทย์จีนไมกส์และสนับสนุนนวัตกรรม | |
| ๑.๕ นางปานทิพย์ ศิริโชติ | คณะทำงาน |
| นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๕ สมุทรสงคราม | |

ข้อ ๒. ให้ ...

ข้อ ๒ ให้คณะทำงานฯ มีหน้าที่และอำนาจ ดังนี้

๒.๑ ศึกษา รวบรวม วิธีการตรวจ COVID-19 ด้วยวิธีทางเทคนิคอณูชีววิทยา

๒.๒ จัดทำคู่มือ แนวทางและข้อแนะนำภาคปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR

๒.๓ ปฏิบัติหน้าที่อื่นๆตามที่ได้รับมอบหมาย

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๑๓ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๓



(นายโอภาส การย์กวินพงศ์)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

5
.....ว่าง
.....พิมพ์
.....ตรวจ

บันทึก

บันทึก

PCR TEST



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
88/7 ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
โทรศัพท์ 0-2951-0000 ต่อ 99566
โทรสาร 0-2951-1021
www.dmsc.moph.go.th