วิธีการตรวจหา COVID-19 ในสิ่งแวดล้อม ด้วยวิธี Real Time PCR
สำหรับเครื่อง Liberty16 System

(PROTOCOL - COVID-19 Real Time PCR for Liberty16 System)

หลักการทำงาน

การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส COVID-19 ที่ทางองค์การอนามัยโลกแนะนำ คือ วิธี Real-time PCR เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง และสามารถตรวจจับเชื้อไวรัสในปริมาณน้อยๆได้ ในรูปแบบของสารพันธุกรรม ไม่ว่าจะเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย สำหรับเทคนิคนี้เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณไวรัสในระดับชีวโมเลกุลที่สามารถติดตามดูปฏิกิริยาได้ทุกระยะระหว่างที่กำลังดำเนินงานอยู่จริง ซึ่งได้ผลลัพธ์มากขึ้น รวดเร็วและลดโอกาสการปนเปื้อน ทั้งยังเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง ในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสเพียงเล็กหน่อยก็สามารถเพิ่มปริมาณจนตรวจพบได้ ดังนั้นวิธี Real Time PCR นี้จึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษาหรือตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนและตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้

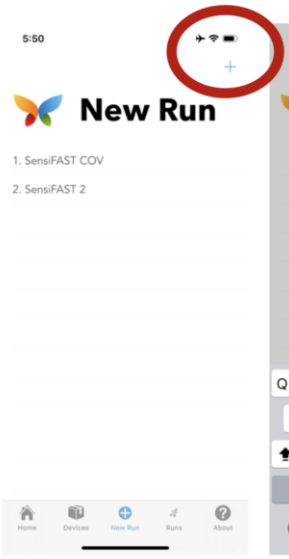
กระบวนการทำงาน

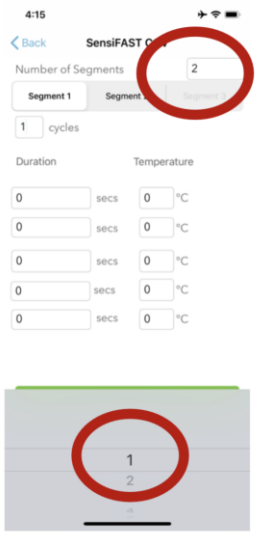
1. เก็บตัวอย่าง
   - 1.1. ตัวอย่าง Swab จากพื้นผิว เช่น โต๊ะ เก้าอี้ เป็นต้น
   - 1.2. ตัวอย่างน้ำ เช่น น้ำเสียจากแหล่งพื้นที่ที่มีความเสี่ยง เช่น ชุมชน โรงพยาบาล เป็นต้น

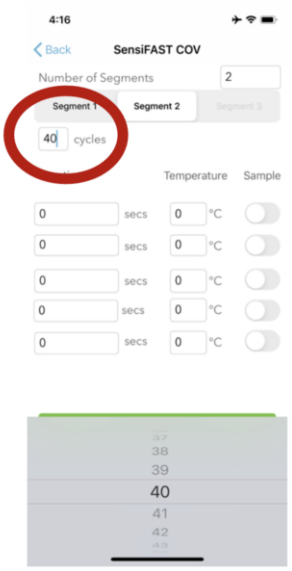
2. การเตรียมตัวอย่าง
   - 2.1. เติมตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอด PCR ขนาด 0.1 มิลลิลิตร พร้อมติดฉลาก (Lebel) ชื่อหรือที่มาของตัวอย่าง
   - 2.2. ทำลายเซลล์ไวรัสด้วย Thermal lysis โดยบ่มหลอด PCR ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (https://www.researchgate.net/post/Any-suggestions-for-simple-methods-of-lysing-RNA-viruses)
   - 2.3. เติมน้ำยา COVID-19 Real Time PCR Mastermix ปริมาตร 20 ไมโครลิตร *(ขึ้นอยู่กับชนิดของชุด KIT ที่ใช้)*

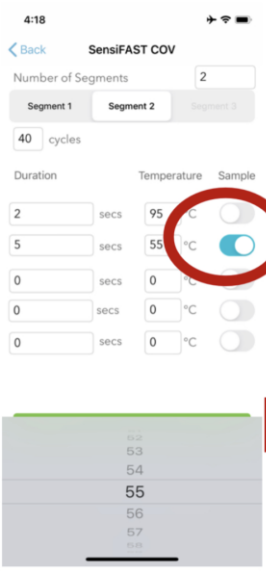
3. การตรวจวิเคราะห์บนเครื่อง Liberty16 Real Time PCR for System
   - 3.1. ดาวน์โหลดและติดตั้ง Liberty16 Application บน iPhone/iPad
   - 3.2. เปิดเครื่อง Liberty16 ที่ปุ่ม power ด้านหลังเครื่อง โดยจะมีไฟสีแดงปรากฏขึ้นบนโลโก้รูปผีเสื้อด้านหน้าเครื่อง และเมื่อเครื่องเชื่อมต่อกับแอพลิเคชั่นบน iPhone/iPad แล้ว สีของไฟแสดงสถานะจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว
   - 3.3. สร้างโปรโตคอลใหม่ โดยกดที่เมนู **New Run** ด้านล่างของหน้าจอ (รูปที่ 1)
   - 3.4. กดที่เครื่องหมาย **+** ที่มุมด้านขวาบน ของหน้าต่าง New Run จะปรากฏหน้าต่างเล็กเพื่อพิมพ์ชื่อโปรโตคอลที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วกดปุ่ม **OK** (รูปที่ 2)
   - 3.5. ตั้งค่าโปรโตคอลที่ต้องการ (รูปที่ 3) ดังข้อมูลในตารางด้านล่าง *(ขึ้นอยู่กับชนิดของชุด KIT ที่ใช้)*

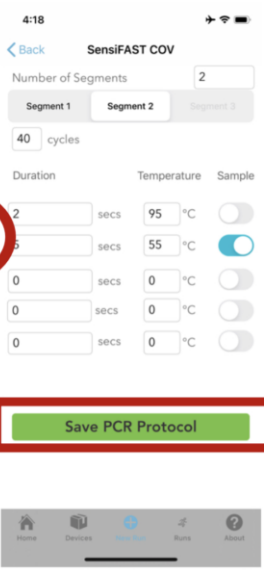
Segment	Process	Cycles	Time/Temperature
1	RT Hot start	1	10 min, 55 °C 30 sec, 95 °C
2	Amplification	40	15 sec, 95 °C 50 sec, 58 °C (Sample **ON**)











รูปที่ 1 รูปที่ 2 รูปที่ 3

3.6. หลังจากตั้งค่าเสร็จแล้วให้กดปุ่ม **Save PCR Protocol** เพื่อบันทึก โดยโปรโตคอลที่สร้างขึ้นมาใหม่จะปรากฏอยู่ในหน้า **New Run** ซึ่งถ้าต้องการแก้ไขสามารถเลื่อนจากขวามาซ้ายที่โปรโตคอลที่ต้องการแก้ไขแล้วกด **Edit**

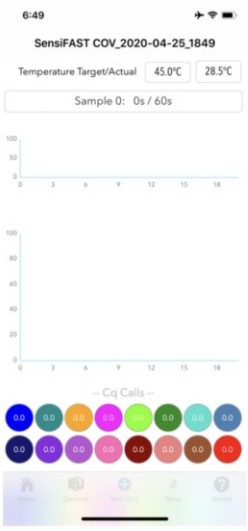
3.7. การเริ่มปฏิกิริยา สามารถทำได้โดยการเลือกโปรโตคอลที่ต้องการใช้งานจากรายการหน้า **New Run** (รูปที่ 4)

3.8. จากนั้นตั้งค่าชื่อของตัวอย่างโดยการกดที่แถบสีเขียว **Name Wells** เพื่อแก้ไขชื่อตัวอย่างหลุมที่ 1-16 ตำแหน่งของหลุมอ้างอิงตามรูปด้านล่าง (รูปที่ 5)

3.9. กดปุ่ม Start PCR Run เพื่อเริ่มงาน โหยหน้าต่างจะแสดงข้อมูล Temperatures profile & Cycles, Fluorescence curve และค่า Cq Calls เพื่อการประเมินผล (รูปที่ 6)

รูปที่ 4

รูปที่ 5



รูปที่ 6

4. การวิเคราะห์ผล

4.1. Negative control: ไม่มี amplification curve และค่า Cq Calls แสดง **na**

4.2. Positive control: มี amplification curve และค่า Cq Calls แสดงค่าอยู่ในช่วง **15-35**

4.3. ตัวอย่างมีผลเป็น**<u>บวก</u>** (Positive): มี amplification curve และค่า Cq Calls แสดงค่า**<u>น้อยกว่า 40</u>**

4.4. ตัวอย่างมีผลเป็น**<u>ลบ</u>** (Negative): ไม่มี amplification curve และค่า Cq Calls แสดงค่า**<u>สูงกว่า 40 หรือ na</u>**

4.5. ตัวอย่างมีผลไม่ชัดเจน (Invalid result): นำตัวอย่างไปทดสอบซ้ำด้วยชุด KIT อื่นเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง