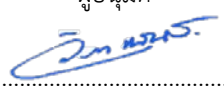
กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติงาน : การตรวจแอนติบอดีต่อเอชไอวี ด้วย วิธี Gel Particle-Agglutination (serodia HIV 1/2 มิกซ์)	รหัส WI-AIDS/STI-011
		วันที่ประกาศใช้ 1 กุมภาพันธ์ 2567
		แก้ไขครั้งที่ 05
		หน้าที่ 1 จาก 13
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการ งานตรวจหาปริมาณไวรัส HIV/HCV/HBV ฯ	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

ผู้จัดทำ   ..... (ทนพญ.พรนิภา สายธนู)
ตำแหน่ง ผู้จัดการวิชาการ งานตรวจหาปริมาณไวรัส HIV/HCV/HBV งานภูมิคุ้มกันวิทยาและงานโรคติดต่อนำ โดยแมลง (มาลาเรีย)

ผู้ทบทวน   ..... (ทนพญ.ทิพวรรณ หมื่นพัน)
ตำแหน่ง ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัส HIV/HCV/HBV และงานภูมิคุ้มกันวิทยา

ผู้อนุมัติ  ..... (ดร.ทนพญ.วิภาวี แสนวงษา)
ตำแหน่ง หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

บันทึก การประกาศใช้ / แก้ไข / ทบทวน

วัน/เดือน/ ปี	ประกาศใช้ / การแก้ไข / ทบทวน	รายละเอียด	ผู้จัดทำ/ผู้ทบทวน
01/06/2563	ประกาศใช้ครั้งแรก	-	พรนิภา
16/04/2564	แก้ไขครั้งที่ 01 ทบทวนเอกสารคุณภาพ ประจำปี 2564	-ทบทวนและแก้ไขตามแนวทางการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีและการตรวจ ติดตามการรักษาปี 2563 ณ พ.ย.2563	พรนิภา
01/10/2564	แก้ไขครั้งที่ 02	จากผลการตรวจประเมินรับรอง มาตรฐานสากล ISO15189:2012, 15190:2003 -แก้ไขหัวข้อ WI จาก 15 หัวข้อ เป็น 17 หัวข้อ	พรนิภา / ทิพวรรณ
20/06/2564	แก้ไขครั้งที่ 03	แก้ไขหัวข้อเอกสารตามข้อกำหนด ISO 15189 จาก 17 ข้อ เป็น 20 ข้อ	พรนิภา / ทิพวรรณ
01/05/2566	แก้ไขครั้งที่ 04	หน้า 13) ทบทวนแนวทางการวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ใหญ่และเด็กที่มีอายุ 24 เดือนขึ้นไป โดยใช้ชุดตรวจที่ตรวจได้เฉพาะแอนติบอดี เป็นชุดตรวจกรองที่ 1	พรนิภา / ทิพวรรณ
01/02/2567	แก้ไขครั้งที่ 05 ตรวจประเมินเฝ้าระวังคุณภาพ ISO 15189:2022 /ISO 15190:2020	หน้าที่ 1) หัวกระดาษ แก้ไขจาก อุบลราชธานี เป็น จังหวัดอุบลราชธานี หน้าที่ 2) ตาราง บันทึก การประกาศใช้ / การแก้ไข / ทบทวน แก้ไขคอลัมน์จาก โดย เป็น ผู้จัดทำ/ผู้ทบทวน ลบคอลัมน์ ฉบับที่ ออก และตัดคำว่า ฉบับที่ ออกจากหัวกระดาษ หน้าที่ 5) ข้อ 8. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย แก้ไขความเข้มข้นการเตรียม Post-cresol จาก 0.5% เป็น 1% หน้าที่ 7) ข้อ 11. วิธีการควบคุมคุณภาพ แก้ไข การทำ IQC จากทำวันแรกของสัปดาห์ที่มีการทดสอบ เป็น ทำทุกครั้งเมื่อมีรายบวก EQA จากครั้งละ 8 ตัวอย่าง เป็น 4 ตัวอย่าง	พรนิภา/ทิพวรรณ

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ	4
2. หลักการและวิธีการที่ใช้ในการทดสอบ	4
3. ความไวและความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์	4
4. ประเภทหรือชนิดของตัวอย่าง	4
5. การเตรียมผู้ป่วย	4
6. ภาชนะบรรจุหรือสารที่ใช้เก็บตัวอย่าง	4
7. เครื่องมือ อุปกรณ์และน้ำยาที่จำเป็น	4
8. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย	5
9. ขั้นตอนการสอบเทียบ	5
10. วิธีปฏิบัติงาน	5
11. วิธีการควบคุมคุณภาพ	7
12. สิ่งรบกวนของการตรวจวิเคราะห์	7
13. ค่าความไม่แน่นอนของการวัด	7
14. ค่าอ้างอิง	7
15. การรายงานผล/การคำนวณผล	7
16. คำแนะนำกรณีผลไม่อยู่ในช่วงการวัด	8
17. ค่าวิกฤต	9
18. การแปลผล	9
19. แหล่งที่มาของค่าแปรปรวน	9
20. เอกสารอ้างอิง/เอกสารที่เกี่ยวข้อง	9
แนวทางการวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ใหญ่และเด็กที่มีอายุ 24 เดือนขึ้นไป โดยใช้ชุดตรวจที่ตรวจได้ทั้งเฉพาะแอนติบอดีเป็นชุดตรวจกรองที่ 1	10
แนวทางการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการในเด็กที่อายุต่ำกว่า 24 เดือน	12

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

วิธีปฏิบัติงาน (Work Instruction)
เรื่อง การตรวจแอนติบอดีต่อเอชไอวีด้วยวิธี Gel Particle-Agglutination
(serodia HIV 1/2 มิกซ์)

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

ซีโรเดีย-เอชไอวี 1/2 มิกซ์ มีวัตถุประสงค์ใช้เป็นเครื่องมือ ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี-1 และ/หรือ เอชไอวี- 2 ช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี-1 และ/หรือเอชไอวี-2 ชุดทดสอบนี้เหมาะสำหรับการตรวจประชากรที่มีความเสี่ยงสูง ชุด ทดสอบนี้ทดสอบกับ พลาสมา หรือซีรัม โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติ สำหรับผู้มีวิชาชีพทางห้องปฏิบัติการและไม่ จำเป็นต้องผ่านการอบรมมาโดยเฉพาะ แต่แนะนำให้ใช้ร่วมกับแผ่นรูปแบบทดสอบที่กำหนดในการตัดสินผลการตรวจ

ซีโรเดีย-เอชไอวี 1/2 มิกซ์ เป็นการตรวจคัดกรองในเชิงคุณภาพ (Qualitative) และไตเตอร์แอนติบอดีของตัวอย่างบวก สามารถแสดงผลเป็นแบบกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) โดยการเจือจางตัวอย่าง

2. หลักการและวิธีการที่ใช้ในการทดสอบ

ซีโรเดีย-เอชไอวี 1/2 มิกซ์ เป็นชุดทดสอบเพื่อการวินิจฉัยภายนอกร่างกายโดยตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ เอชไอวี-1 และ/หรือเอชไอวี- 2 โดยเคลือบผิวอนุภาคเจลาตินด้วยรีคอมบิแน้นแอนติเจนของเชื้อเอชไอวี-1 (HIV-1/gp41 และ HIV-1/p24) และแอนติเจนของเชื้อเอชไอวี-2 (HIV-2/gp36) ชุดทดสอบซีโรเดีย-เอชไอวี 1/2 มิกซ์ (การเกาะกลุ่มของอนุภาค) นี้อาศัยหลักที่ว่าอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยแอนติเจนจะเกาะกลุ่มกับแอนติบอดี ต่อเชื้อเอชไอวี-1 และ/หรือเอชไอวี- 2 ในซีรัม/พลาสมาที่มีอยู่

GPA = Gel Particle-Agglutination

3.ความไวและความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์

Sensitivity (ความไว) = 100 %

Specificity (ความจำเพาะ) = 99.80 %

องค์ประกอบของโปรตีนที่ใช้ในชุดตรวจ HIV-1 : r-gp41, r-p24

HIV-2 : r-gp36

คำย่อ r=recombinant protein โปรตีนเชื่อมต่อหรือโปรตีนลูกผสม

p= synthetic peptide

4. ประเภทหรือชนิดของตัวอย่าง

- Serum
- Plasma

5. การเตรียมผู้ป่วย

-

6. ภาชนะบรรจุหรือสารที่ใช้เก็บตัวอย่าง

6.1 หลอดบรรจุเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง

6.2 หลอดบรรจุเลือดที่มี EDTA, Lithium heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง

7. เครื่องมือ อุปกรณ์และน้ำยาที่จำเป็น

7.1 ชุดทดสอบ ซีโรเดีย-เอชไอวี 1/2 มิกซ์

7.2 ไมโครเพลท ถาดหลุมก้นรูปตัวยู ("U" shaped FASTEC)

7.3 Autopipette ขนาด 10-100 µl และ Tip สำหรับหยดและเจือจางสิ่งส่ง ตรวจ

7.4 Autopipette ขนาด 100-1000 µl และ Tip สำหรับละลายผงเจลาติน

7.5 ถุงมือใช้ครั้ง เดียว / ภาชนะทิ้งขยะติดเชื้อ

7.6 นาฬิกาจับเวลา

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

8. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

8.1 น้ำยาทั้งหมดในชุดทดสอบ ใช้เพื่อวินิจฉัยภายนอกร่างกาย

8.2 สวมใส่ PPE ที่เหมาะสมทุกครั้ง ที่ต้องปฏิบัติงานกับสิ่งส่ง ตรวจผู้ป่วย

8.3 สวมถุงมือทุกครั้งเมื่อทำการทดสอบตัวอย่างผู้ป่วยที่อาจจะมีโอกาสสัมผัสกับเลือดหรือน้ำเหลืองของผู้ป่วยได้ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าหากมือเป็นแผลหรือถลอกและต้องล้างมือด้วยสบู่หรือน้ำยาฆ่าเชื้อก่อนใส่ถุงมือและหลังถอดถุงมือออกด้วยทุกครั้ง

8.4 เนื่องจากไม่มีชุดทดสอบใดให้หลักประกันความปลอดภัย ว่าจะไม่มีเชื้อเอชไอวี เชื้อตับอักเสบชนิดบี หรือชนิดซี หรือเชื้ออื่นๆ จึงต้องระวังสิ่งส่ง ตรวจว่ามีโอกาสติดเชื้อได้และพึงปฏิบัติด้วยความระมัดระวัง

8.5 ทำความสะอาดพื้นที่ก่อนและหลังการปฏิบัติงานกับสิ่งส่ง ตรวจ ด้วย 70 % Alcohol และแช่อุปกรณ์ เช่น Tip ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ Post-cresol (เตรียม 1 ซอง ต่อ น้ำ 0.5 ลิตร ความเข้มข้น 1%) ก่อนทิ้งเป็นขยะติดเชื้อ

8.6 เครื่องมือเครื่องใช้ทจี่ ะต้องสัมผัสกับเลือดหรือน้ำเหลืองของผู้ป่วย หลังทำการตรวจวิเคราะห์ต้องเช็คและทำความสะอาดด้วย 70% Alcohol

9. ขั้นตอนการสอบเทียบ

Autopipette ได้รับการสอบเทียบโดย บริษัท ดอกเตอร์ คาลิเบรชั่น จำกัด นาฬิกาจับเวลา โดยเทียบเวลากับ สำนักงานสมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น) กำหนดการสอบเทียบปีละ 1 ครั้ง

10. วิธีปฏิบัติงาน

10.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การเก็บน้ำเหลือง (Serum/Plasma)

10.1.1 การเก็บตัวอย่างซีรั่ม (Serum)

- เจาะเลือด Clotted blood ประมาณ 3-5 ml (อย่างน้อย 2 ml) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที ให้นำส่งห้องปฏิบัติการทันที หรือเก็บเลือดที่ 2-8°C ไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง
- ปั่นเลือดที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 3000 rpm 10 นาที หากมีก้อน clot ให้แยกออกก่อนการตรวจ ตรวจภายใน 4 ชั่วโมง เก็บที่ 2-8°C หากนานกว่า 5 วัน เก็บที่ -20°C ไม่ควร freeze-thaw ซ้ำ

10.1.2 การเก็บตัวอย่างพลาสมา (Plasma)

- เจาะเลือดใส่ที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ประมาณ 3 ml ให้นำส่งห้องปฏิบัติการทันที หรือเก็บเลือดที่ 2-8°C ไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง
- ปั่นเลือดที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 3000 rpm 10 นาที ตรวจภายใน 4 ชั่วโมง เก็บที่ 2-8°C หากนานกว่า 5 วัน เก็บที่ -20°C ไม่ควร freeze-thaw ซ้ำ

10.2 ขั้นตอนการเตรียมน้ำยา

สารแขวนตะกอน (suspension) ทั้ง sensitized particles และ control particles ต้องทำให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันก่อนใช้โดยการเขย่าขวดก่อนนำมาใช้ทดสอบ ติดสติ๊กเกอร์ระบุ วันที่เติมเปิด/,วันที่ Exp และผู้เตรียมก่อนนำมาใช้ต้องปล่อยให้น้ำยามีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้องเสียก่อน (15-30°C) 15-30 นาที

การน้ำยาที่อยู่ในชุดทดสอบ น้ำยาที่อยู่ในชุดทดสอบมี 2 แบบ คือ

1. น้ำยาพร้อมใช้ได้ทันที มีดังนี้

Reagent A : สารละลายอนุภาค (Reconstituting Solution)

Reagent B : น้ำยาเจือจางสิ่งส่งตรวจ (Sample diluent)

Reagent E : สารควบคุมบวก (Positive control)

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

2. สารเคมีสำหรับทำละลาย

Reagent C : อนุภาคที่เคลือบด้วยแอนติเจน (sensitized particles)

ละลายด้วย Reconstituting Solution (reagent A) ให้ได้ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร สำหรับชุดทดสอบขนาด 100 การทดสอบ

Reagent D : อนุภาคควบคุม D (control particles)

ละลายด้วย reconstituting solution (reagent A) ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับชุด ทดสอบขนาด 100 การทดสอบ

สภาพที่ใช้งานได้-การเก็บรักษา

ชุดทดสอบที่เปิดใช้งานแล้วให้เก็บที่ 2-10°C เก็บได้นานเท่ากับเวลาที่ระบุไว้ข้างขวด ยกเว้นน้ำยาดังนี้ Reagent C และ Reagent D จะคงสภาพใช้ได้ 14 วันหลังจากวันละลาย

10.3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

วิธีการทดสอบคัดกรองเชิงคุณภาพ (Qualitative Assay Method)

10.3.1 ใช้ Autopipette ดูด diluent 75 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 ของไมโครเพลทและอีก 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 2 และ 3

10.3.2 ใช้ Autopipette ดูด ซีรัมหรือพลาสมา 25 ไมโครลิตร ถ่ายลงหลุมที่ 1 ผสมกับของเหลวในหลุมโดยการดูดขึ้นและถ่ายลง 5 ถึง 6 ครั้ง จากนั้นดูดสารผสมนั้น 25 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลุมที่ 2 ผสมของเหลวในหลุมที่ 2 โดยการทำซ้ำเหมือนครั้งแรกแล้ว ถ่ายของผสมนั้น 25 ไมโครลิตรลงหลุมที่ 3 ผสมให้เข้ากันโดยทำเช่นเดิมแล้วดูดทิ้งไป 25 ไมโครลิตร

10.3.3 ใช้ Autopipette ดูด control particles ที่เขย่าผสมแล้ว หยด 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 2 และดูดsensitized particles ที่เขย่าผสมแล้ว หยด 25 ไมโครลิตร ลงในหลมที่ 3

10.3.4 ทำการผสมส่วนผสมทั้งหมดในไมโครเพลทให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอโดยให้เคาะไมโครเพลทเบาๆ 5-6 ครั้ง หาฝาครอบถาดหลุมแล้วนำไปวางไว้ที่ปราศจากการสั่นสะเทือน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15-30 °C) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วอ่านผล ผล สามารถอ่านได้หลัง 24 ชั่วโมง โดยที่รูปแบบการเกาะกลุ่มไม่เปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด

ตาราง การทดสอบคัดกรองในเชิงคุณภาพ (Qualitative Test Procedure)

ตำแหน่งหลุม	**1**	**2**	**3**
น้ำยาเจือจางสิ่งส่งตรวจ (Serum diluent) (µl)	75	25	25
สิ่งส่งตรวจ (Specimen) (µl)	25	25	25
ความเจือจางของสิ่งส่งตรวจ (Specimen dilution)	1:4	1:8	1:16
อนุภาคควบคุม (Control particles) (µl)		25	
อนุภาคที่เคลือบด้วยแอนติเจน (Sensitized particles) (µl)			25
ความเจือจางสุดท้าย		1:16	1:32
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ plate mixer (automatic vibratory shaker) ปิดหรือครอบเพลท รออ่านผล 2 ชั่วโมง			
แปลผล			

ทิ้งไป 25 µl

10.3.5 ระยะเวลาการเก็บสิ่งส่งตรวจหลังตรวจวิเคราะห์

- Primary tube เก็บ 7 วัน
- Serum / Plasma รายงานผล Negative เก็บ 7 วัน
- Serum / Plasma รายงานผล Reactive เก็บ 1 ป

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

10.4 ขั้นตอนการรายงานผล

บันทึกผลการตรวจลงใน แบบฟอร์มบันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ าน Serology (F-AIDS STI-030)

11. วิธีการควบคุมคุณภาพ

การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal quality control: IQC)

- Anti-HIV Serodia (GPA) ทำการทดสอบ IQC โดยทำทุกครั้งเมื่อมีรายบวก พร้อมบันทึกการทดสอบลงในแบบ บันทึก IQC (F-LAB-004) และเก็บผลการทดสอบในแฟ้ม IQC-Anti-HIV serodia

การควบคุมคุณภาพภายนอก (External Quality Assurance; EQA)

มีการควบคุมคุณภาพภายนอกจาก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุดรธานี ปีละ 3 ครั้งๆ ละ 4 ตัวอย่าง บันทึกการทดสอบลงในแบบบันทึก แผนการรับส่ง EQA (F-AIDS/STI-011) และเก็บผลการทดสอบในแฟ้ม EQA-Anti-HIV

12. สิ่งรบกวนของการตรวจวิเคราะห์

12.1 พลาสมา หรือซีรัม ที่ปนเปื้อน หรือที่มีไขมันสูง หรือ ที่มีเม็ดเลือดแดงแตกปนอยู่ จะรบกวนการอ่านผลปฏิกิริยา

12.2 สิ่งส่งตรวจแต่ละตัวอย่างที่ทดสอบแบบ semi-quantitative หรือ qualitative ต้องได้ผลทดสอบเป็นลบกับ control particles (ที่ 1:16 final dilution)

12.3 ส่วนผสมของ sample diluent ทั้งกับ sensitized particles และ control particles ที่ผสมแล้วจะต้องไม่เกิดปฏิกิริยา (-) ทุกครั้งที่ทดสอบ (reagent control)

12.4 ในการทดสอบ semi-quantitative ผลของ positive control ทุกครั้งอยู่ที่ final dilution 1:128 (+- 1 dilution)

12.5 หากผลการทดสอบมีปฏิกิริยา (Reactive) ควรทำการทดสอบอีก 2 วิธี เพื่อยืนยันต่อไป

13. ค่าความแน่นอนของการวัด

-

14. ค่าอ้างอิง

Negative

15. การรายงานผล / การคำนวณผล

อนุภาครวมกันตรงกลางเป็นกระดุมรูปก้นหลุม มีขอบนอกกลมเรียบคมชัด = Non-reactive

อนุภาคเกาะกลุ่มกันหนาแน่นแผ่ทั่วก้นหลุมอย่างสม่ำเสมอ = Reactive

อนุภาครวมกันเป็นรูปวงแหวนเล็กหนาที่ก้นหลุม มีขอบนอกกลมเรียบคมชัด = Inconclusive

การอ่านและการแปลผลการเกาะกลุ่ม

การก่อตัวของอนุภาค	การอ่าน	การแปลผล
อนุภาครวมกันตรงกลางเป็นกระดุมรูปก้นหลุม มีขอบนอกกลมเรียบคมชัด	(-)	ผลลบ
อนุภาครวมกันเป็นรูปวงแหวนเล็กหนาที่ก้นหลุม มีขอบนอกกลมเรียบคมชัด	(±)	ผลก้ำกึ่ง
อนุภาคก่อตัวเป็นวงแหวนขนาดใหญ่ มีขอบนอกไม่เรียบ มีการเกาะกลุ่มผิวภายนอก	(+)	ผลบวก
อนุภาคเกาะกลุ่มกันหนาแน่นแผ่ทั่วก้นหลุมอย่างสม่ำเสมอ	(++)	

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

ผลการตรวจและรายงานต่างๆ ต้องรักษาไว้เป็นความลับ วิธีการรายงานผลมีดังนี้

1. รายงานผลเป็นลบ (Anti-HIV Negative) เมื่อผลการตรวจโดยชุดตรวจแรก ไม่มีปฏิกิริยา (non-reactive)
2. รายงานผลเป็นบวก (Anti-HIV Positive) เมื่อผลการตรวจทั้ง 3 ชุดตรวจโดยห้องปฏิบัติการเดียวกันให้ผลมีปฏิกิริยา (reactive) ตรงกัน
3. รายงานผล สรุปผลไม่ได้ว่าติดเชื้อหรือไม่ติดเชื้อ (Inconclusive) เมื่อผลการตรวจทั้ง 3 วิธี ไม่ตรงกัน

16. คำแนะนำกรณีผลไม่อยู่ในช่วงการวัด

วิธีปฏิบัติเพื่อการดูดซับ (absorption procedure) ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (± หรือ positive) กับทั้ง control และ sensitized particles สมควรนำมาทดสอบใหม่ ดังนี้

a) เติม control particle ที่ผสมแล้ว 0.35 มิลลิลิตร (350 ไมโครลิตร) ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก

b) เติมสิ่งส่งตรวจ 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองนั้น ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง (15-30°C) อย่างน้อย 20 นาที

c) นำไปปั่นแยกโดยใช้ความเร็วรอบ 2000 rpm นาน 5 นาที นำส่วนใสข้างบน (1:8 specimen dilution) 50 ไมโครลิตร เติมลงในไมโครเพลท หลุมที่ 2

d) เติม sample diluent 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 3 และหลุมอื่นๆจนถึงหลุมที่ 12 แล้วทำการถ่ายสิ่งส่งตรวจ จากหลุมที่ 2 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปยังหลุมที่ 3 แล้วผสมให้เข้ากันให้ดี ตามแนวทางการทดสอบคัดกรอง เชิงปริมาณ (quantitative assay) ทำการถ่ายจากหลุมที่ 3 ไปยังหลุมอื่นในทำนองเดียวกันจนครบหลุมที่ 12 เพื่อให้ได้ 2-fold dilution

ตามตาราง

ตำแหน่งหลุม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
น้ำยาเจือจางสิ่งส่งตรวจ (Serum diluent) (µl)	75	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
สิ่งส่งตรวจ หรือสารควบคุมบวก (Specimen or Positive control)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
ความเจือจางของสิ่งส่งตรวจ (Specimen dilution)	1:4		1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192
อนุภาคควบคุม (Control particles)		25										
อนุภาคที่เคลือบด้วยแอนติเจน (Sensitized particles) (µl)			25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
ความเจือจางสุดท้าย (Final dilution)		1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384

ดูดทิ้ง 25 µl

ดำเนินการเจือจางตัวอย่างจากหลุมที่ 2-12
ผสมให้เข้ากันโดยให้เคาะไมโครเพลทเบาๆ 5-6 ครั้งปิดหรือครอบเพลท รออ่านผล 2 ชั่วโมง
แปลผล

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

17. ค่าวิกฤต

-

18. การแปลผล

อนุภาคควบคุม	อนุภาคที่เคลือบด้วยแอนติเจน	ผลการทดสอบ
-	+	Positive (บวก)
-	-	Negative (ลบ)
+	-	Negative (ลบ)
+	+	Indeterminate (ก้ำกึ่ง)
หลังจากผ่านกระบวนการดูดซับ*		
-	+	Positive (บวก)
-	-	Negative (ลบ)

เกณฑ์การแปลผล (Interpretation Criteria)

* บางสิ่งส่งตรวจอาจต้องการ กระบวนการดูดซับ (absorption) 2 ครั้ง

<u>เกณฑ์การแปลผล</u>

สิ่งส่งตรวจใดไม่ทำปฏิกิริยาต่อ control particles (final dilution 1:16) แต่ทำปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับ sensitized particles (final dilution 1:32 หรือมากกว่า) เป็นการแสดงว่าการทดสอบให้ปฏิกิริยาเป็นบวกต่อเอชไอวี (positive reaction to HIV)

สิ่งส่งตรวจใดทำปฏิกิริยา (reactive) ต่อ control particles แต่ไม่ทำปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับ sensitized particles ให้พิจารณาว่า การทดสอบให้ปฏิกิริยาลบต่อเอชไอวี (negative reaction to HIV)

19. แหล่งที่มาของค่าแปรปรวน

19.1 แยกซีรัมหรือพลาสมาออกจากเลือดแข็งตัว (clot) หรือ เม็ดเลือดแดงโดยเร็วที่สุดเพื่อหลีกเลี่ยงการแตกของเม็ดเลือดแดงอันจะรบกวนการทดสอบ ตัวอย่างที่ขุ่นควรทำให้ใสโดยการปั่นแยกออกก่อนการทดสอบ ชิ้นส่วนของ fibrin หรือตะกอน อาจให้ผลบวกปลอมได้

19.2 ไม่ควรใช้สิ่งส่งตรวจทั้งพลาสมา หรือ ซีรัมที่ปนเปื้อน หรือที่มีไขมันสูง หรือที่มีเม็ดเลือดแดงแตกปน

19.3 การตรวจเลือดหาเชื้อเอชไอวี แม้ว่าจะมีแนวปฏิบัติที่ชัดเจน ทำให้สามารถรายงานผลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติอาจพบการแปลผลที่สรุปผลไม่ได้ (inconclusive) เนื่องจากปัจจัยหลายอย่างตั้งแต่ธรรมชาติและ ระยะเวลาของการติดเชื้อ ซึ่งระยะแรกของการติดเชื้ออาจพบแอนติบอดีในระดับต่ำ ต้องอาศัยการตรวจหา HIV genome

20. เอกสารอ้างอิง / เอกสารที่เกี่ยวข้อง

20.1 ชุดตรวจ Serodia HIV1/2 Mix (SD-AIDS/STI-001)

20.2 ใบขอส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ (STIs Lab) (F-AIDS/STI-034)

20.3แบบฟอร์มบันทึกผลการตรวจวิเคราะห์งาน Serology (F-AIDS STI-030)

20.4 แบบบันทึกรับ-ส่ง ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ (F-AIDS/STI-032)

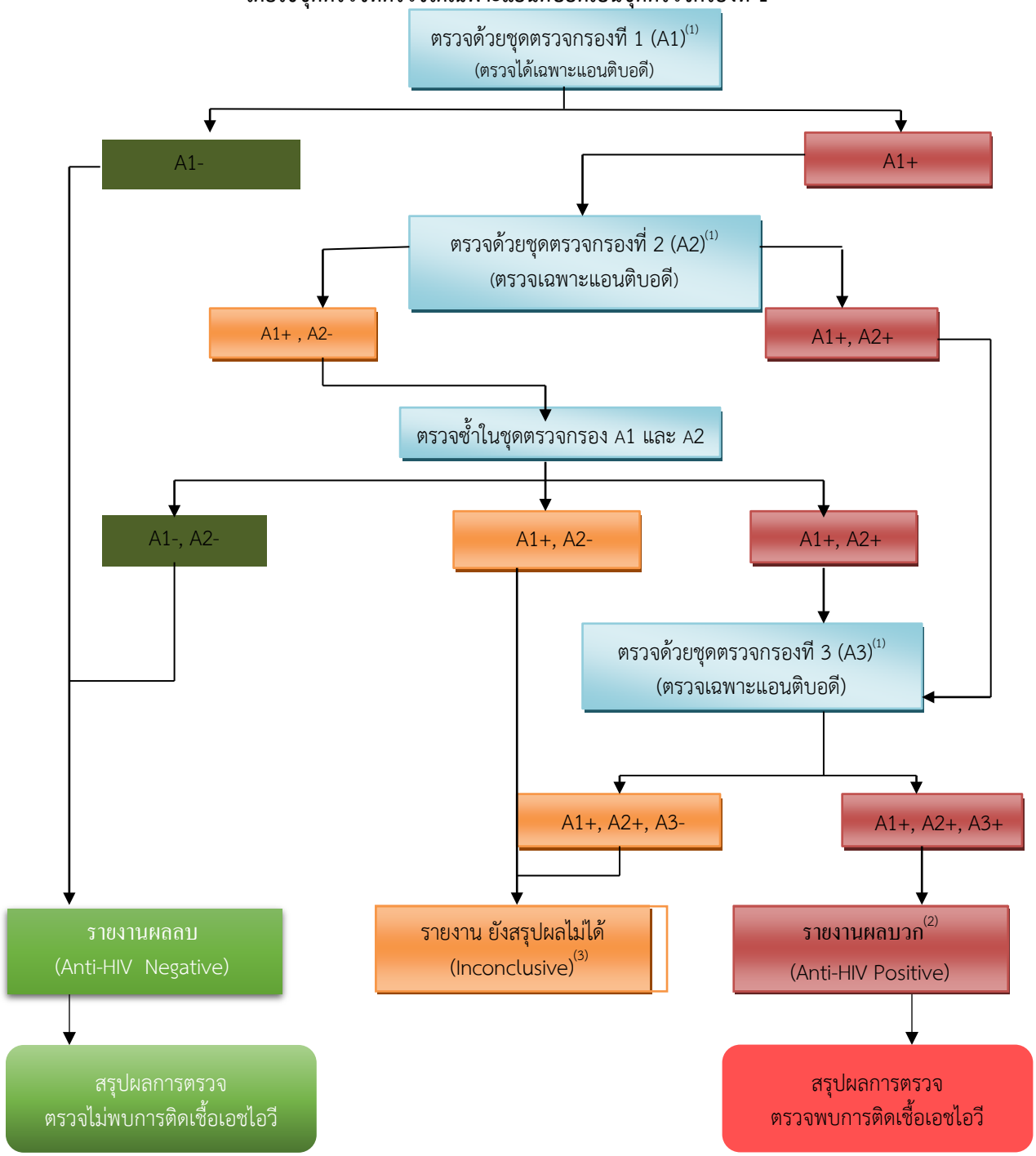
20.5 แบบบันทึก IQC (F-LAB-004)

20.6 แบบบันทึก แผนการรับส่ง EQA (F- AIDS/STI-011)

20.7 แนวทางการตรวจวินิจฉัย รักษา และป้องกัน การติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทยปี 2564/2565 (SD-DPC10lab-289)

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

แนวทางการวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ใหญ่และเด็กที่มีอายุ 24 เดือนขึ้นไป โดยใช้ชุดตรวจที่ตรวจได้เฉพาะแอนติบอดีเป็นชุดตรวจกรองที่ 1



หมายเหตุ A1 =Alere Determine HIV1/2, A2= bioline HIV-1/2, A3 = Gel Particle-Agglutination (GPA)

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

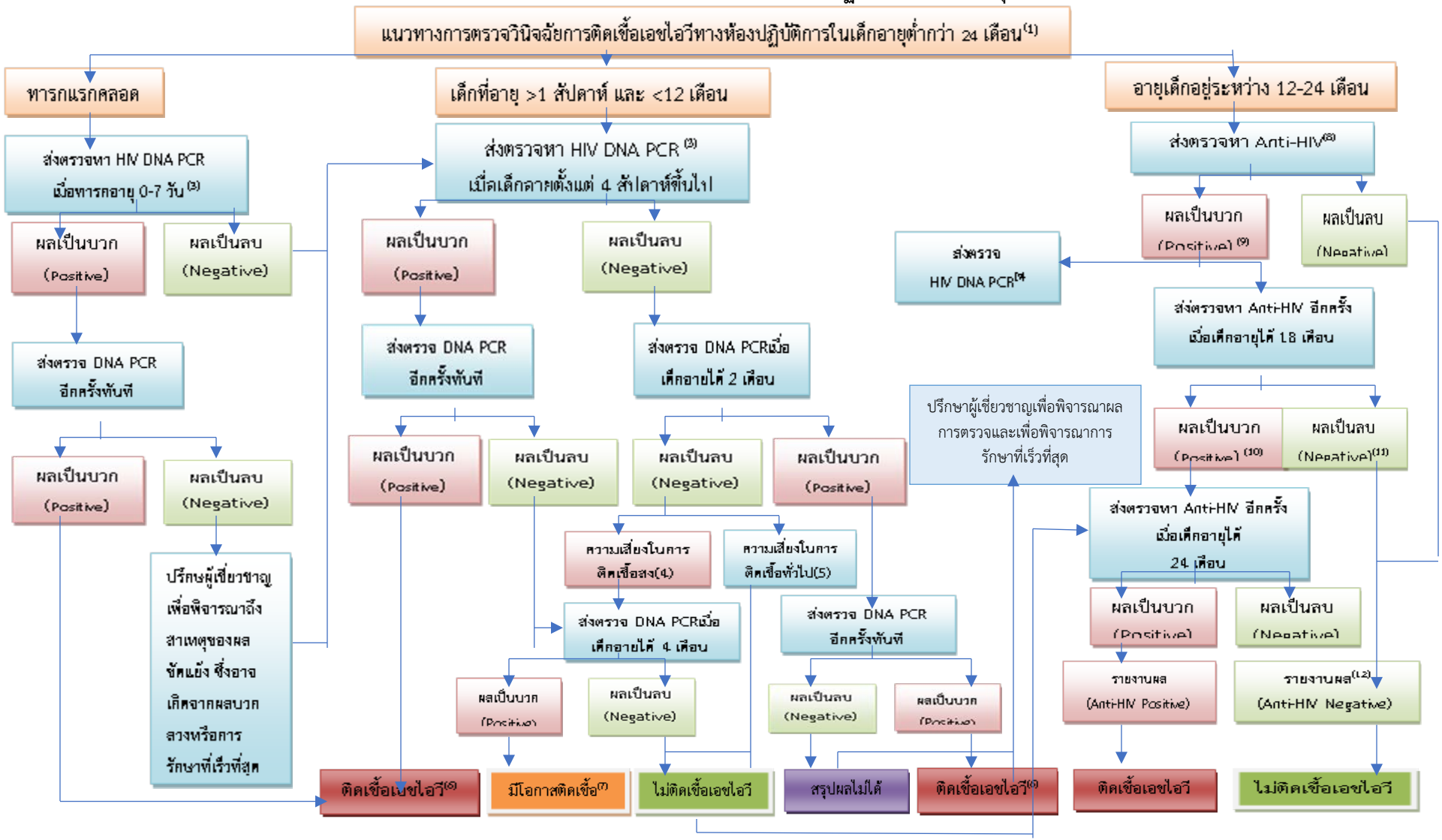
(1) A1, A2และ A3 หมายถึงชุดตรวจกรองที่1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยเป็นชุดตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวีที่สามารถ ตรวจได้เฉพาะแอนติบอดีอย่างเดียวและต้องมีแอนติเจนสำหรับตรวจหาแอนติบอดีแตกต่างกันใน A1, A2 และ A3 โดยชุดตรวจ A1 มีความไวสูงสุด และชุดตรวจ A2 และ A3 มีความจำเพาะสูงขึ้นตามลำดับ

(2) ในกรณีผลบวก (positive) ให้รายงานผลตรวจให้กับผู้เกี่ยวข้องแล้วตรวจสอบประวัติหากพบว่าเป็นผู้ติดเชื้อราย ใหม่หรือตรวจเป็นครั้งแรก (newly diagnosed) ควรแนะนำให้เจาะเลือดตัวอย่างที่ 2 เพื่อยืนยันตัวบุคคล โดยใช้ ชุดตรวจกรองเดิมอย่างน้อย 1 วิธี

(3) การรายงานผลสรุปผลไม่ได้(inconclusive) ให้ติดตามผู้รับบริการตรวจซ้ำที่ 2 สัปดาห์โดยทดสอบใหม่ตามลำดับ ขั้นตอน A1, A2 และ A3 เช่นเดิม หากผลการตรวจเป็น “สรุปผลไม่ได้” เหมือนเดิม ให้สรุปผล “ตรวจไม่พบการ ติดเชื้อเอชไอวี”

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

แนวทางการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการในเด็กที่ อายุต่ำกว่า 24 เดือน



เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต

หมายเหตุA1 =Alere Determine HIV1/2, A2= bioline HIV-1/2, A3 = Gel Particle-Agglutination (GPA)

(1) ในกรณีไม่ทราบประวัติการติดเชื้อเอชไอวีของแม่ สามารถใช้วิธกี ารตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีเพื่อช่วยในการวินิจฉัย หากผลการตรวจไม่มีปฏิกิริยาแสดงว่าเด็กไม่ติดเชื้อ แต่หากผลการตรวจมีปฏิกิริยา และเด็กมีอายุต่ำกว่า 24 เดือน ให้ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงด้วยวิธี DNA PCR ต่อ ไป

(2)วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงโดยวิธี DNA PCR หรือ NAT เชิงคุณภาพมีด้วยกันหลายวิธี ผู้ใช้ควรศึกษาวิธีการแปลผลให้เข้าใจกอ่ นนำไปใช้ในการวินิจฉัย

(3)เมื่อทำการตรวจเด็กอายุ 4 สัปดาห์ขึ้นไป เฉพาะเด็กที่คลอดจากแม่ที่มีความเสี่ยงสูง (high risk) ผลการตรวจ DNA PCR เมื่อเป็นทารกอายุ 0-7 วัน จะไม่นำ “ผลลบ” มาใช้นับจำนวนครั้ง (4)เด็กมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ (high risk) ได้แก่ VL ของแม่ใกล้คลอด >50 copies/mL แม้ไม่ได้กินยา หรือ กินยาไม่สม่ำเสมอ หรือ กินยาต่อเนื่องน้อยกว่า 12 สัปดาห์ เด็กกินนมแม่ที่ติดเชื้อในระยะ เฉียบพลัน

(5)เด็กมีความเสี่ยงทั่วไป (standard risk) ได้แก่ VL ของแม่ใกล้ คลอด ≤ 50 copies/mL แม่กินยาสูตร 3 ตัว และกินยาสม่ำเสมอ และกินยาต่อเนื่องมากกว่า 12 สัปดาห์ (6)เด็กทุกรายที่รายงานผลการติดเชื้อเอชไอวีจากการตรวจ DNA PCR ให้ตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีซ้ำอีกครั้ง เมื่อเด็กมีอายุ 18-24 เดือนขึ้นไป เพื่อเป็นหลักฐานด้านการวินิจฉัย และการรักษาแล้วไม่ว่าผล การตรวจแอนติบอดีจะเป็นบวกหรือลบ ให้คงการรักษาเด็กด้วยยาต้านเอชไอวีต่อไป

(7)เด็กที่มีความเสี่ยงที่จะติดเชื้อ ให้ปรึกษาผู้เชี่ยวชาญเพื่อให้เด็กได้รับยาต้านเอชไอวี และให้ตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีซ้ำอีกครั้งเมื่อเด็กมีอายุ 18-24 เดือนขึ้นไป เพื่อเป็นหลักฐานด้านการการวินิจฉัยและ การรักษา แลว้ ไม่ว่าผลการตรวจแอนติบอดีจะเป็นบวกหรือลบให้คงการรักษาเด็กด้วยยาต้านเอชไอวีต่อไป

8)หากเป็นเด็กอายุ 24 เดือนขึ้นไป ให้ใช้แนวทางเดียวกันกับแนวทางการตรวจวินจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี ตามแผนภูมิ

(9)เด็กอายุ 12-24 เดือน ที่ผลการตรวจ Anti-HIV เป็นบวก หากสงสัยว่ามีการติดเชื้อเอชไอวี และยังไม่เคยได้รับการตรวจ HIV DNA PCR มาก่อน ให้ส่งตรวจ HIV DNA PCR เพื่อยืนยันการวินิจฉัย ถ้าผล PCR

เป็นบวก แสดงว่าติดเชื้อ ให้ทำการรักษาโดยเร็ว ถ้าผลเป็นลบให้ปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ

(10)การตรวจด้วยชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีด้วยน้ำยาที่มีแอนติเจนต่างกัน 3 วิธี และให้ผลมีปฏิกิริยาทั้ง 3 วิธี รวมทั้งมีการตรวจซ้ำด้วยเลือดครั้งที่ 2 หากเป็นการตรวจครั้งแรกหรือยังไม่มีอาการตาม ดุลยพินิจของแพทย์

(11)กรณีที่ผลPCR ได้ผลบวก 2 ครงั้งและเด็กได้รับยาสม่ำเสมอ แต่ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีแล้วได้ผล “ไม่มีปฏิกิริยา” ใหป้ รึกษาผู้เชี่ยวชาญ

(12)ก่อนการแปลผลว่า “ไม่ติดเชื้อเอชไอวี” ควรตรวจสอบว่าเด็กไม่ได้กินนมแม่มาแล้วอย่างน้อย 6

เนื่องจากปัจจุบันชุดตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวีมีความไวเพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถตรวจปริมาณแอนติบอดีในระดับต่ำๆได้ ดังนั้น แอนติบอดีของแม่ที่ยังค้างในเลือดของลูกถึงแม้จะมีระดับต่ำ แต่อาจให้ผลบวกกับชุดตรวจในปัจจุบันนี้ได้ จนเด็กมีอายุได้ 18-24 เดือน

เอกสารควบคุมสำหรับใช้ในหน่วยงานที่ระบุภายในสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี ห้ามทำสำเนาก่อนได้รับอนุญาต