

 กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 1 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกันวิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

ผู้จัดทำ (นางทิพวรรณ หมื่นพันธ์)
ตำแหน่ง ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกันวิทยา

ผู้ตรวจสอบ (นางสาวพรนิภา สายธนู)
ตำแหน่ง ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัสตับอักเสบบี และงานภูมิคุ้มกันวิทยา

ผู้อนุมัติใช้ (นางวิภาวี แสนวงษา)
ตำแหน่ง หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

 กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวี วิธีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 3 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหา ปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกัน วิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

สารบัญ

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

 กระทรวงสาธารณสุข MINISTRY OF PUBLIC HEALTH กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวี วิธีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 4 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหา ปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกัน วิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)

เรื่อง การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ RNA ของเชื้อ HIV-1 ในพลาสมา ที่เก็บโดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ชุดน้ำยาดังกล่าวใช้ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ และใช้ประกอบกับอาการของผู้ติดเชื้อ เพื่อใช้ในการพยากรณ์การดำเนินของโรค และติดตามผลของการได้รับยาต้านไวรัส

ชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 สามารถใช้ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อเพื่อช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อ หลังจากที่ได้ผลการตรวจแอนติบอดีให้ผลบวก

2. หลักการและวิธีการที่ใช้ในการทดสอบ

ชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 เป็นชุดตรวจเชิงปริมาณที่สามารถตรวจหาปริมาณของอาร์เอ็นเอของเชื้อเอชไอวี-1, ในอีดีทีเอพลาสมาของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ โดยทำงานบนระบบเครื่องโคบาสรุ่น 8800 แต่ไม่สามารถแยกชนิดเชื้อเอชไอวี-1 ออกเป็นกรุปเอ็ม กรุปโอ หรือกรุปเอ็นได้ การวัดปริมาณ HIV-1 RNA นั้นเกิดจากการเปรียบเทียบผลของ HIV-1 target กับปริมาณของ HIV-1 QS ที่ทราบจำนวน ซึ่งเติมลงไปในแต่ละการตัวอย่างทดสอบตั้งแต่ขั้นตอนของการสกัดสารพันธุกรรม ซึ่ง HIV-1 QS นี้จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาดังแต่ขั้นตอนการสกัด การเพิ่มปริมาณและการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม เพื่อให้การทดสอบเป็นไปอย่างถูกต้องทุกขั้นตอน นอกจากนี้ในการทดสอบยังใช้ตัวอย่างควบคุมจากภายนอก 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างควบคุมบวก 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุมลบ 1 ตัวอย่าง

หลักการ

ชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 มีระบบการเตรียมตัวอย่างตรวจแบบอัตโนมัติ (การสกัดกรดนิวคลีอิกและทำให้บริสุทธิ์) ตามด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีพีซีอาร์ และการตรวจวัดผล ระบบเครื่องโคบาสรุ่น 8800 ประกอบด้วยโมดูลของสิ่งส่งตรวจ (sample supply module) ทรานสเฟอร์โมดูล (transfer module) โพรเซสซิงโมดูล (processing module) และอะนาลิติกโมดูล (analytic module) ระบบการจัดการข้อมูลโดยอัตโนมัติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปของเครื่องโคบาสรุ่น 8800 โดยรายงานผลการทดสอบเป็นปริมาณของเชื้อ หากปริมาณของเชื้ออยู่ในช่วงที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งสามารถดูผลการทดสอบได้จากหน้าจอของระบบโดยตรงและสามารถพิมพ์ผลการทดสอบได้

กรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างตรวจจะถูกเติมน้ำยาอมอร์อาร์เอ็นเออินเทอร์นัลคอนโทรล (Amored RNA Internal Control, IC) เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายในสำหรับการเตรียมตัวอย่าง การเพิ่มจำนวน และการตรวจวัด ซึ่งจะถูกสกัดตัวอย่างไปพร้อมๆกัน นอกจากนี้ในการทดสอบยังใช้ตัวอย่างควบคุมจากภายนอก 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างควบคุมบวก 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุมลบ 1 ตัวอย่าง เมื่อเติมเอนไซม์ โปรตีนเนสและน้ำยาย่อยสลายเซลล์ลงในตัวอย่างตรวจ กรดนิวคลีอิกของไวรัสจะถูกปล่อยออกมา และจะจับกับสารซิลิกาที่เคลือบอยู่บนผิวของอนุภาคแม่เหล็ก (Magnetic Glass Particles) ส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาและส่วนที่ไม่บริสุทธิ์ เช่น โปรตีนที่เสียสภาพ เศษเซลล์และส่วนที่ยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (เช่น ฮีโมโกลบิน) จะถูกล้างออกตามด้วยขั้นตอนการล้างกรดนิวคลีอิกที่บริสุทธิ์จากอนุภาคแม่เหล็กที่เคลือบผงแก้วโดยใช้ไอลูชันบัฟเฟอร์ (Elution Buffer) ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น

 กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 5 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกันวิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป้าหมายแบบจำเพาะของตัวอย่างตรวจจากผู้ติดเชื้อ สามารถทำได้โดยใช้ ไพรเมอร์ชนิด forward และ reverse ที่ออกแบบให้จำเพาะกับส่วนอนุรักษ์ (conserve region) ในกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส โดยใช้เอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ที่ทนต่อความร้อน ถูกใช้สำหรับขั้นตอน รีเวอร์สทรานสคริปชัน และขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ (amplification) น้ำยาแม่สตอร์มิกซ์จะประกอบด้วย deoxyuridine triphosphate (dUTP) แทนที่จะเป็น deoxythymidine triphosphate (dTTP) ซึ่ง dUTP นี้จะถูกรวมเข้าไปในสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ที่เรียกว่า แอมพลิคอน (amplicons) หากมีแอมพลิคอนเก่าซึ่งปนเปื้อนมาจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในรอบก่อนก็จะถูกทำลายโดยเอนไซม์แอมพ์อีเรส (uracil-N-glycosylase) ซึ่งผสมรวมอยู่ในน้ำยาแม่สตอร์มิกซ์ในขั้นตอนการเพิ่มความร้อนรอบแรก อย่างไรก็ตามแอมพลิคอนสายใหม่จะไม่ถูกทำลาย เพราะเอนไซม์แอมพ์อีเรสไม่ทำงานที่อุณหภูมิเกินกว่า 55 องศาเซลเซียส

น้ำยาแม่สตอร์มิกซ์ของชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 ประกอบด้วยตัวตรวจจับ (detection probes) ที่จำเพาะกับกรดนิวคลีอิกของเชื้อเอชไอวี-1 และน้ำยาควบคุมภายใน ซึ่งแต่ละตัวตรวจจับจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ทำหน้าที่เป็น Reporter และจะมีสารเรืองแสงตัวที่ทำหน้าที่เป็น Quencher สัญญาณสารเรืองแสงของตัวตรวจจับที่ไม่มีการจับจะถูกกดพลังงานด้วย quencher dye ในระหว่างเกิดการขยายสัญญาณปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ตัวตรวจจับจะเกิดปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่จำเพาะและจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสซึ่งมีคุณสมบัติของ 5'-3' nuclease ทำให้ reporter dye หลุดห่างออกจาก quencher dye และสามารถปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสง Fluorescence ได้ ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะทำให้โฟรแบ็กออก และมีการปล่อยแสง Fluorescence เพิ่มขึ้น และสะสมค่าที่วัดได้เพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบ ทำให้วัดผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส แบบ Real-time

3. ความไวและความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์

ชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 สามารถทำการตรวจวัดปริมาณ HIV-1 RNA ได้ตั้งแต่ 20 – 10,000,000 copies/mL

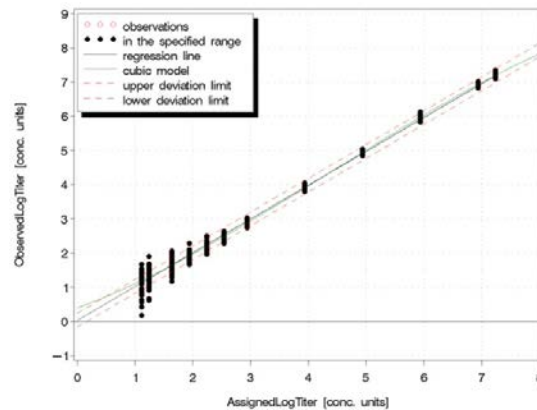
3.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear Range)

การศึกษาความเป็นเส้นตรงของชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 ได้ถูกตรวจประเมินกับชุดตัวอย่างแบบ 12 ความเข้มข้น (ปริมาตรตัวอย่างทดสอบ 500 ไมโครลิตร) และแบบ 11 ความเข้มข้น (ปริมาตรตัวอย่างทดสอบ 200 ไมโครลิตร) ในช่วงที่มีกราฟเป็นเส้นตรงสำหรับเอชไอวี -1 กรุ๊ปเอ็ม สับหทัยปี โดยชุดตัวอย่างตรวจนี้เตรียมจากส่วนที่ลอยอยู่ของเซลล์เพาะเลี้ยงเชื้อเอชไอวี-1ที่มีค่าอาร์เอ็นเอของเอชไอวี-1 สูง และการประเมินเป็นตามข้อกำหนดของ CLSI Guideline EP06-A น้ำยา 3 รุนการผลิตถูกวิเคราะห์ด้วยระบบเครื่องโคบาส 6800/8800 จำนวน 3 เครื่อง ผู้ตรวจวิเคราะห์ 3 คน โดยทดสอบซ้ำทั้งหมด 16 ครั้ง ต่อ 1 ชุดตัวอย่าง ต่อรุ่นการผลิตตลอดการทดสอบ 4 วัน (ทดสอบซ้ำ 4 ครั้งต่อรุ่นน้ำยาที่ผลิตและต่อวัน)

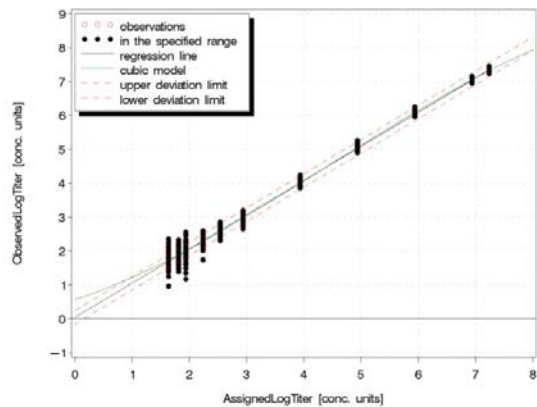
ปริมาตรตัวอย่างตรวจ 500 ไมโครลิตร ชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 สามารถตรวจได้ในช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 20 ถึง 10 ล้านหรือ 1.00×10^7 ก๊อปปี้/มิลลิลิตร (33.33 ถึง 1.67×10^7 IU/mL) และแสดงค่าเบี่ยงเบนสมมูลจากช่วงค่าความถดถอยที่ไม่เป็นเส้นตรง(non-linear regression) น้อยกว่า $\pm 0.2 \log_{10}$ ในอิตาลีที่เฝ้าพลัสมานุษย์ (รูปประกอบที่ 1) ช่วงค่าเป็นเส้นตรงมีความถูกต้องแม่นยำในการทดสอบอยู่ในช่วง $\pm 0.2 \log_{10}$

ปริมาตรตัวอย่างตรวจ 200 ไมโครลิตร ชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 สามารถตรวจได้ในช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 50 ถึง 10 ล้านหรือ 1.00×10^7 ก๊อปปี้/มิลลิลิตร (83.3 ถึง 1.67×10^7 IU/mL) และแสดงค่าเบี่ยงเบนสมมูลจากช่วงค่าความถดถอยที่ไม่เป็นเส้นตรง(non-linear regression) น้อยกว่า $\pm 0.2 \log_{10}$ ในอิตาลีที่เฝ้าพลัสมานุษย์ (รูปประกอบที่ 2) ช่วงค่าเป็นเส้นตรงมีความถูกต้องแม่นยำในการทดสอบอยู่ในช่วง $\pm 0.2 \log_{10}$

 กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 6 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกันวิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค



รูปที่ 1 การหาค่าความเป็นเส้นตรงในอิตีที่เพลาสมามนุษย์ (ปริมาตร 500 ไมโครลิตร)



รูปที่ 2 การหาค่าความเป็นเส้นตรงในอิตีที่เพลาสมามนุษย์ (ปริมาตร 200 ไมโครลิตร)

3.2 การทดสอบความจำเพาะ

ค่าความจำเพาะของชุดตรวจเอชไอวี-1 ถูกประเมินจากการวิเคราะห์ตัวอย่างตรวจอิตีที่เพลาสมา ของผู้บริจาคที่ให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสเอชไอวีจำนวน 600 ตัวอย่างตรวจ กับชุดตรวจโคบาสเอชไอวี-1 2 รุ่นการผลิต ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดให้ผลลบต่อการตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 ความจำเพาะของชุดตรวจโคบาส ของ panel ทดสอบ เอชไอวี-1 นี้มีค่าร้อยละ 100 (ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 99.5)

4. ประเภทหรือชนิดของตัวอย่าง

- Plasma EDTA

5. การเตรียมผู้ป่วย

- ไม่จำเป็นต้องงดน้ำ/อาหารก่อนเจาะเลือด
- ต้องรับประทานยาต้านไวรัสอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 2-3-เดือนก่อนเจาะเลือด
- ไม่ควรเจาะเลือดหากผู้ป่วยมีไข้ติดเชื้อต่างๆ หรือได้รับวัคซีน ควรเลื่อนการเจาะเลือดไปอีก 1 เดือน

 กระทรวงสาธารณสุข MINISTRY OF PUBLIC HEALTH กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 7 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกันวิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

6. ภาชนะบรรจุหรือสารที่ใช้เก็บตัวอย่าง

- EDTA 6 ml
- Plasma Preparation Tubes (PPT)

ใช้พลาสมาที่ได้จากการปั่นแยกเลือดจากหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA หรือใช้หลอดสุญญากาศชนิด EDTA ที่เตรียมพลาสมาของเบ็คตันดิกคินสัน (Plasma Preparation Tubes; PPT)

- เก็บ whole blood ไว้ที่ 2-25 ° C ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมงหลังจากการเจาะเลือด และให้ปั่นแยกพลาสมาภายในเวลา 6 ชั่วโมง หลังเจาะเลือดด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดูพลาสมาเก็บไว้ใน polypropylene tube sterile

7. เครื่องมือ อุปกรณ์และน้ำยาที่จำเป็น

7.1 เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas 8800

7.2 ชุดน้ำยา ประกอบด้วย ชุดน้ำยา Cobas 8800 96 test เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 ° C น้ำยาที่ยังไม่ได้เปิดใช้งานจะมีอายุได้ถึงวันหมดอายุที่ระบุ แต่หลังจากมีการเปิดใช้ครั้งแรกแล้วให้เก็บน้ำยาที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 ° C ซึ่งจะมีอายุการเก็บรักษาได้ 30 วันหรือจนกระทั่งวันหมดอายุที่ระบุแล้วแต่ว่าวันใดถึงก่อน น้ำยาสามารถใช้ได้สูงสุด 10 รอบการทำงานหรือ 8 ชั่วโมงบนเครื่อง Cobas 8800

7.3 Autopipette & Tip ขนาด 1000 ul

7.4 BSC class II

ตารางแสดงเงื่อนไขการหมดอายุของน้ำยาตามข้อบังคับบนระบบเครื่องโคบาส 8800

น้ำยา	วันหมดอายุของชุดตรวจ	ความคงทนของชุดตรวจเมื่อเปิดใช้	จำนวนรอบที่สามารถทำงานได้ในชุดตรวจ	ความคงทนของน้ำยาบนเครื่อง (เวลาที่สะสมบนเครื่องเมื่ออยู่นอกตู้เย็น)
ชุดตรวจโคบาส เอชไอวี-1	ไม่เกินวันที่กำหนด	30 วันตั้งแต่เปิดใช้ครั้งแรก	สูงสุด 10 รอบ	สูงสุด 8 ชั่วโมง
ชุดตัวอย่างควบคุมสำหรับน้ำยาโคบาสเอชบีวี/ เอชซีวี/ เอชไอวีวัน	ไม่เกินวันที่กำหนด	ไม่เกี่ยวข้อง	ไม่เกี่ยวข้อง	สูงสุด 8 ชั่วโมง
พลาสมาคนปกติที่เป็นตัวควบคุมลบ	ไม่เกินวันที่กำหนด	ไม่เกี่ยวข้อง	ไม่เกี่ยวข้อง	สูงสุด 10 ชั่วโมง
น้ำยาสำหรับทำให้อนุภาคไวรัสแตก	ไม่เกินวันที่กำหนด	30 วันตั้งแต่เปิดใช้ครั้งแรก	ไม่เกี่ยวข้อง	ไม่เกี่ยวข้อง
น้ำยาที่ผสมอนุภาคแม่เหล็กเคลือบผงแก้วเอ็มจีพี	ไม่เกินวันที่กำหนด	30 วันตั้งแต่เปิดใช้ครั้งแรก	ไม่เกี่ยวข้อง	ไม่เกี่ยวข้อง
น้ำยาสำหรับเจือจางสิ่งส่งตรวจ	ไม่เกินวันที่กำหนด	30 วันตั้งแต่เปิดใช้ครั้งแรก	ไม่เกี่ยวข้อง	ไม่เกี่ยวข้อง
น้ำยาสำหรับล้าง	ไม่เกินวันที่กำหนด	30 วันตั้งแต่เปิดใช้ครั้งแรก	ไม่เกี่ยวข้อง	ไม่เกี่ยวข้อง

 กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 8 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกันวิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

8. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

8.1 ห้องปฏิบัติการมีการเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมาที่ส่งตรวจ HIV VL เพิ่มอีก 1 หลอด เก็บแช่แข็งไว้ สำหรับการตรวจหา HIV DR หากผลการส่งตรวจ HIV VL >1,000 copies/mL

8.2 ผลการตรวจ HIV VL ใช้เพื่อการติดตามประเมินผลการดูแลรักษา แต่อาจนำไปใช้เพื่อช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีในระยะเฉียบพลันตามดุลยพินิจของแพทย์

8.3 สวมใส่ PPE ที่เหมาะสม ทุกครั้งที่ต้องปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย

8.4 สวมถุงมือทุกครั้งเมื่อทำการทดสอบตัวอย่างผู้ป่วย ที่อาจจะมีโอกาสสัมผัสกับเลือดหรือน้ำเหลืองของผู้ป่วยได้ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าหากมือเป็นแผลหรือถลอก) และต้องล้างมือด้วยสบู่หรือน้ำยาฆ่าเชื้อก่อนใส่ถุงมือและหลังถอดถุงมือออกด้วยทุกครั้ง

8.5 ทำความสะอาดพื้นที่ก่อนและหลังการปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจ ด้วย 70 % Alcohol และเช็ดอุปกรณ์ เช่น Tip ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ Post-cresol (เตรียมทุกวัน 1 ชอง ต่อ น้ำ 1 ลิตร) ก่อนทิ้งเป็นขยะติดเชื้อ

8.6 เครื่องมือเครื่องใช้ที่จะต้องสัมผัสกับเลือดหรือน้ำเหลืองของผู้ป่วย หลังทำการตรวจวิเคราะห์ต้องเช็ดและทำความสะอาดด้วย 70 % Alcohol

9. ขั้นตอนการสอบเทียบ

-

10. วิธีปฏิบัติงาน

10.1 Pre-analysis

10.1.1 ตรวจสอบความถูกต้องระหว่างใบนำส่ง และ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

10.1.2 ตรวจสอบสิทธิคนไข้จากระบบ Nap online

10.1.3 ลงทะเบียนรับตัวอย่างในระบบ off line

10.1.4 กรณีพบสิ่งที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด ลงบันทึกในแบบบันทึกการปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ

(F-AIDS/STI-024)

10.2 Analysis

10.2.1 เตรียมความพร้อมใช้งานเครื่อง Cobas 8800 ตาม คู่มือการใช้งานเครื่อง Cobas 6800 / 8800 ฉบับภาษาไทย

10.2.2 ติดสติ๊กเกอร์บาร์โค้ด ที่ primary tube ตรวจสอบชื่อ สกูล HN Nap number ให้ตรงกัน

10.2.3 กรณีปริมาณตัวอย่างไม่ถึงที่กำหนด ใช้ Autopipette ดูดพลาสมา 800 µl ใส่ secondary tube

10.2.4 เรียงตัวอย่างตาม serial number จัดเรียงใน sample rack

10.2.5 นำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ กดสั่งงานผ่านหน้าจอเครื่อง

10.2.6 เมื่อเครื่องตรวจวิเคราะห์เสร็จแล้ว ผู้ทำการตรวจวิเคราะห์สามารถป้อนผลจากเครื่องได้

10.2.7 ใช้ Pasture pipette ดูดแยกพลาสมาใส่ หลอดฝาเกลียว polypropylene หลอดละ 1100 – 1200 ul /คน เก็บที่ -70 °C

10.2.8 เก็บ primary tube เพื่อรอการทวนสอบ 7 วัน

 กระทรวงสาธารณสุข MINISTRY OF PUBLIC HEALTH กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 9 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกันวิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

10.3 Post-analysis

- 10.3.1 บันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ใน ระบบ offline และแบบฟอร์มทะเบียน/ลงผล Viral load (F-AIDS/STI-006)
- 10.3.2 ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ระหว่าง เครื่องตรวจวิเคราะห์ และ ระบบคอมพิวเตอร์ โดยบันทึกใน บันทึกการตรวจสอบผลการตรวจวิเคราะห์ (checking) (F-LAB-018)
- 10.3.3 ลงผลการตรวจวิเคราะห์ในระบบ Nap Online สามารถดูขั้นตอนการรายงานผลใน วิธีปฏิบัติงานการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (WI-LAB-007)
- 10.3.4 รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ในรูปแบบจดหมายอิเล็กทรอนิกส์ (Email) และจดหมายราชการ

10.4 ระยะเวลาเก็บส่งตรวจหลังตรวจวิเคราะห์

- 10.4.1 Primary tube เก็บที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน
- 10.4.2 Plasma ที่มีผล VL < 1,000 c/ml จะเก็บที่ -70 C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน หากครบเวลาและไม่มีปัญหาใดๆ ผู้รับผิดชอบจะดำเนินการทิ้งเป็นขยะติดเชื้อ
- 10.4.3 Plasma ที่มีผล VL > 1,000 c/ml จะถูกดำเนินการส่งตรวจ HIV Drug Resistance

11. วิธีการควบคุมคุณภาพ

11.1 การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal quality control: IQC)

ทุกครั้งที่ run ให้ run control ทั้ง 3 ระดับ (Negative, Low positive and High positive) ควบคุมด้วยทุกครั้ง แล้วบันทึกการทดสอบลงในแบบบันทึก IQC (F-LAB-004) และเก็บผลการทดสอบในแฟ้ม IQC/EQA HIV Viral Load หมายเลข 3.1.1(1)

11.2 การควบคุมคุณภาพภายนอก (External quality assurance; EQA)

มีการควบคุมคุณภาพภายนอกจาก QCMD ปีละ 2 ครั้งๆละ 4 ตัวอย่าง บันทึกการทดสอบลงในแบบบันทึก แผนการรับส่ง EQA (F-AIDS/STI-011) และเก็บผลการทดสอบในแฟ้ม IQC/EQA HIV Viral Load หมายเลข 3.1.1(1)

12. สี่รบกวนของการตรวจวิเคราะห์

12.1 ไตรกลีเซอไรด์	ที่อยู่ในระดับสูงกว่า	34.5 g/L
12.2 conjugated bilirubin	ที่อยู่ในระดับสูงกว่า	0.25 g/L
12.3 unconjugated bilirubin	ที่อยู่ในระดับสูงกว่า	0.25 g/L
12.3 อัลบูมิน	ที่อยู่ในระดับสูงกว่า	58.7 g/L
12.4 ฮีโมโกลบิน	ที่อยู่ในระดับสูงกว่า	2.9 g/L
12.5 ดีเอ็นเอมนุษย์	ที่อยู่ในระดับสูงกว่า	2 mg/L

13. ค่าความไม่แน่นอนของการวัด

-

14. คำอ้างอิง

Target Not Detected

 กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวี วิธีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 10 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหา ปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกัน วิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

15. การรายงานผล / การคำนวณผล

15.1 รายงาน Copies/ml + Log10

15.2 HIV-1 RNA not detected

การแปลงหน่วยของเอชไอวี-1 คือ 0.6 cp/IU.

16. คำแนะนำกรณีผลไม่อยู่ในช่วงการวัด

- สำหรับ > Titer max หากต้องการทราบค่าที่แน่นอน ให้ทำการ dilute พลาสมาตัวอย่างด้วย HIV-1-negative human plasma แล้วทำการทดสอบซ้ำ นำผลที่ได้มาคูณกลับด้วย dilution factor
- ตัวอย่างที่มีปริมาณ HIV-1 สูงกว่า linear range มากๆ อาจทำให้เกิดผล invalid ได้ ด้วย “QS_INVALID” ถ้าต้องการดูค่าที่แน่นอนให้ทำการ dilute พลาสมาตัวอย่างด้วย HIV-1-negative human plasma แล้วทำการทดสอบซ้ำ นำผลที่ได้มาคูณกลับด้วย dilution factor

17. คำวิฤต

-

18. การแปลผล

การแปลผล

- การทดสอบครั้งนั้นจะ valid หากคอนโทรลทุกตัวไม่ปรากฏ flags หากคอนโทรลตัวใดตัวหนึ่งแสดง invalid (_N_NC_INVALID , _L_LPCINVALID , _H_HPCINVALID) หมายถึงการทดสอบครั้งนั้น invalid ด้วย
CTM (-) C: ผลที่ถูกต้องคือ “Target Not Detected”
Positive Controls: ผลที่ถูกต้องคือได้ค่าอยู่ระหว่างค่าที่กำหนดไว้ ซึ่งเฉพาะเจาะจงสำหรับแต่ละ kit และระบุไว้อยู่ใน Controls Value Card
- ตรวจสอบผลของ specimen แต่ละรายโดยดูจาก flags หรือ comments ในใบรายงานผลร่วมด้วย
Flags หรือ comments ของ specimen บางอันไม่ได้หมายถึง specimen นั้น invalid การแปลผลของ specimen เป็นตามตาราง

 กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวี วิธีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 11 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหา ปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกัน วิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

ผลตรวจในตัวอย่างตรวจจะถูกตัดออกเมื่อผลจากตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบของทั้งชุดให้ผลถูกต้องเท่านั้น นอกจากนี้ผลการทดสอบทั้งหมดสามารถแปลผลได้ดังนี้

Result	การแปลผล
Target Not Detected	ตรวจไม่พบสัญญาณของไวรัสเอชไอวี-1 รายงานผลได้ว่า “HIV-1 RNA not detected”
< Titer min	คำนวณค่า copies/mL ได้น้อยกว่าค่า Limit of Quantitation ของเทสต์ รายงานผลได้ว่า “HIV-1 RNA detected, less than titer min” Titer min = 20 cp/mL and 33 IU/mL (500 μL) Titer min = 50 cp/mL and 83 IU/mL (200 μL)
Titer	คำนวณค่า copies/mL ได้มากกว่าหรือเท่ากับ titer min และ น้อยกว่าหรือเท่ากับ titer max ซึ่งอยู่ในระหว่าง Linear Range ของเทสต์ รายงานผลได้ว่า “(titer) HIV-1 RNA detected ”
> Titer max	คำนวณค่า copies/mL ได้มากกว่า Linear Range ของเทสต์ รายงานผลได้ว่า “greater than titer max” Titer max = 1.00E+07 cp/mL and 1.67E+07 IU/mL (500 μL and 200 μL)

สำหรับ > Titer max หากต้องการทราบค่าที่แน่นอน ให้ทำการ dilute พลาสมาตัวอย่างด้วย HIV-1-negative human plasma แล้วทำการทดสอบซ้ำ นำผลที่ได้มาคูณกลับด้วย dilution factor

- ตัวอย่างที่มีปริมาณ HIV-1 สูงกว่า linear range มากๆ อาจทำให้เกิดผล invalid ได้ ด้วย “QS_INVALID” ถ้าต้องการค่าที่แน่นอนให้ทำการ dilute พลาสมาตัวอย่างด้วย HIV-1-negative human plasma แล้วทำการทดสอบซ้ำ นำผลที่ได้มาคูณกลับด้วย dilution factor

19. แหล่งที่มาของค่าแปรปรวน

19.1 ก่อนการใช้งานควรเก็บหลอด PPT tube ที่อุณหภูมิ 4-25°C หากเก็บไว้ในที่อุณหภูมิสูง อาจจะทำให้ปริมาณ vacuum ไม่ได้ตามจำนวนที่ระบุข้างหลอด และทำให้มีการเสื่อมสภาพของ gel ที่อยู่ในหลอด

19.2 ควรเก็บหลอดในตำแหน่งตั้งขึ้นเสมอ

19.3 หลังจากทำการเจาะเลือดผู้ป่วยลงใน PPT tube ให้ทำการ mix เลือดทันที 6-8 ครั้ง เพื่อป้องกันการเกิด micro-clots

19.4 ให้ทำการปั่นเลือดทันทีหลังจากการเจาะเก็บเลือด หรือไม่ควรเกิน 24 ชม. หลังจากการเจาะเก็บเลือด โดยทำการปั่นที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที

 กรมควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๐ จังหวัดอุบลราชธานี	วิธีปฏิบัติ: การตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวี วิธีด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ด้วยเครื่อง Cobas 8800	รหัส WI-AIDS/STI-021
		วันที่ประกาศใช้ 23 มิถุนายน 2565
		ฉบับที่ 01 แก้ไขครั้งที่ 01
		หน้าที่ 12 จาก 12
กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี	ผู้จัดทำ : ผู้จัดการวิชาการงานตรวจหา ปริมาณไวรัสเอชไอวีและงานภูมิคุ้มกัน วิทยา	ผู้อนุมัติ : หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

20. เอกสารที่เกี่ยวข้อง / เอกสารอ้างอิง

20.1 คู่มือการใช้งาน Cobas 6800 / 88000 (ฉบับภาษาไทย)	(SD-DPC10lab-247)
20.2 คู่มือการใช้งาน Cobas 6800/8800 (ฉบับภาษาอังกฤษ)	(SD-DPC10lab-248)
20.3 ใบขอส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเอชไอวี	(F-AIDS STI-003)
20.4 แบบฟอร์มลงทะเบียน ลงผล Viral load	(F-AIDS STI-006)
20.5 K-carrier order	(F-AIDS STI-009)
20.6 แผนการรับส่งEQC	(F-AIDS STI-011)
20.7 แบบบันทึก IQC	(F-LAB-004)
20.8 บันทึกการตรวจสอบผลการตรวจวิเคราะห์ (rechecking)	(F-LAB-018)
20.9 วิธีปฏิบัติงาน การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	(WI-LAB-007)