





แผนกพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา


วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง การตรวจ HIV

WI-LAB-067


แก้ไขครั้งที่ 3

ผู้จัดทำ ร.ต. 
(ศาสตราจารย์ ไชยพงศ์)
ผู้จัดการวิชาการภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก
1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้ทบทวน ร.ท.หญิง 
(อรกัญญา ทรงทอง)
ผู้จัดการคุณภาพ
1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้อนุมัติ พ.อ. 
(ฉัตรมงคล คนขยัน)
หัวหน้าห้องปฏิบัติการ
1 กุมภาพันธ์ 2566

วันที่ประกาศใช้: 1 กุมภาพันธ์ 2566

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 1 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ(purpose of examination)

A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)

เพื่อตรวจวิเคราะห์หา HIV-1 p24 antigen และ Antibody ต่อ HIV-1 รวมทั้ง group O และ HIV-2 ใน serum และ plasma โดยวิธี Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Elecsys e 601 (Roche Diagnostics)

A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโออนไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0)

เพื่อตรวจวิเคราะห์หา antibody ทุกไอโซไทป์ (IgG, IgM, และ IgA) ที่จำเพาะต่อเชื้อ HIV-1 และ HIV-2 รวมทั้งสับไทป์ โอ เชิงคุณภาพแบบรวดเร็ว จากตัวอย่างตรวจที่เป็น serum, plasma และเลือดครบส่วนของมนุษย์ โดยวิธี immunochromatography ของชุดทดสอบ เอสดี ไบโออนไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0)

A3 : ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2


เพื่อตรวจวิเคราะห์หา antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ HIV-1 และ HIV-2 เชิงคุณภาพ จากตัวอย่างตรวจที่เป็น serum, plasma และเลือดครบส่วนของมนุษย์ โดยวิธี immunochromatography ของชุดทดสอบ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี – 1/2

2. หลักการและวิธีการของขั้นตอนที่ใช้สำหรับการทดสอบ (principle and method of procedure used for examinations)

2.1. (A1) การตรวจ HIV combi ใช้เวลาในการทดสอบ 27 นาที อาศัยหลักการ sandwich immunoassay

- ในขั้นแรกเติม Pretreatment ผสมกับสิ่งส่งตรวจ จากนั้นเติม biotinylated monoclonal anti-p24 antibodies/HIV-specific recombinant antigens/HIV-specific peptides และ monoclonal anti-p24 antibodies/HIV-specific recombinant antigens/HIV-specific peptides ซึ่งติดฉลากกับ ruthenium complex ลงไปก็จะเกิดเป็น sandwich กับ HIV combi ในตัวอย่าง
- เมื่อเติม microparticles ที่เคลือบด้วย streptavidin ลงไป sandwich complex ที่มี Ru(bpy)₃²⁺ จะถูกตรึงไว้บน microparticles จากนั้นส่วนผสมจะถูกดูดเข้าไปที่ measuring cell ซึ่ง microparticles จะถูกดูดไว้ด้วยแม่เหล็ก สารที่ไม่เกี่ยวข้องจะถูกแยกออกด้วย ProCell
- เมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่าน electrode จะทำให้เกิด chemiluminescent emission ซึ่งจะถูกวัดปริมาณโดย photomultiplier tube เครื่อง Elecsys 601 จะคำนวณผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเทียบสัญญาณที่วัดได้จากปฏิกิริยาของตัวอย่างกับ calibration curve ที่ได้จากการทำ HIV combi โดยอัตโนมัติ

2.2. (A2) ชุดทดสอบเอสดี ไบโออนไลน์ เอชไอวี - 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV-1/2 3.0) ประกอบด้วยแผ่นทดสอบที่เคลือบด้วยรีคอมบิแนนท์แอนติเจนของเชื้อ HIV-1/2 (gp41, p24, gp36) ตัวอย่างตรวจและรีคอมบิแนนท์แอนติเจนของเชื้อ HIV-1/2 (gp41, p24, gp36) – คอลลอยด์ โกลด์ คอนจูเกต จะซึมผ่านเมมเบรนแบบโครมาโตกราฟีเคลื่อนที่ไปทางแถบทดสอบ (T) และเกิดเป็นคอมเพล็กซ์โกลด์ของแอนติเจน-แอนติบอดี-แอนติเจน มองเห็นเป็นแถบสีด้วยตาเปล่าโดยมีความไวและความจำเพาะสูง แถบทดสอบและ

| | | | |
|--|---|-------------------------------------|--|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 2 จาก 31 หน้า | |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 | |

แถบควบคุมจะแสดงอยู่บนช่องอ่านปฏิกิริยาโดยเลข “1” คือแถบทดสอบ 1 “2” คือแถบทดสอบ 2 และตัวอักษร “C” คือแถบควบคุม

2.3. (A3) ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอรัมมีน เอชไอวี-1/2 เป็นการทดสอบแบบอิมมูโนโครมาโตกราฟฟิก เพื่อใช้ตรวจแอนติบอดีต่อ HIV-1 และ HIV-2 แบบเชิงคุณภาพ ใส่ตัวอย่างตรวจลงบนบริเวณแผ่นซับสำหรับตัวอย่าง จากนั้นตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านบริเวณแผ่นซับของคอนจูเกตไประหว่างการเคลื่อนที่ไป ตัวอย่างจะผสมกับซีลีเนียมคอลลอยด์-แอนติเจนคอนจูเกต ส่วนผสมนี้จะเคลื่อนต่อไปพบกับรีคอมบิเนนต์แอนติเจนและเพปไตด์สังเคราะห์ที่ตรึงอยู่บนบริเวณแผ่นที่ช่องอ่านปฏิกิริยาของผู้ป่วย ถ้าในตัวอย่างมีแอนติบอดีต่อ HIV-1 และ/หรือ HIV-2 แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจน-ซีลีเนียมคอลลอยด์ และแอนติเจนที่ตรึงอยู่บนบริเวณช่องอ่านปฏิกิริยาของผู้ป่วยเกิดเป็นเส้นสีแดง ถ้าไม่มีแอนติบอดีต่อ HIV-1 และ/หรือ HIV-2 ในตัวอย่างแอนติเจน-ซีลีเนียมคอลลอยด์จะเคลื่อนผ่านช่องอ่านปฏิกิริยาของผู้ป่วยไป และไม่ปรากฏเส้นสีแดงที่ช่องอ่านปฏิกิริยาของผู้ป่วย เพื่อให้มีความถูกต้องของการทดสอบ ได้มีแถบควบคุมการทดสอบ (procedural control bar) รวมอยู่ด้วย

3. ลักษณะทางประสิทธิภาพ (performance characteristics)


A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)

3.1. คุณลักษณะด้านความแม่นยำ(Precision) :

เป็นการตรวจสอบความแม่นยำโดยใช้ตัวอย่างตรวจจากมนุษย์และสารควบคุมคุณภาพ ตามแนวปฏิบัติ EP5-A2 ของ CLSI วันละ 2 ครั้ง แบบ Duplicate เป็นเวลา 21 วัน (จำนวนทั้งหมด 84 ครั้ง) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง cobas e 601 ร่วมกับน้ำยา Elecsys Anti-HIV combi PT ได้ผลดังนี้

| MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 and cobas e 602 analyzers | | | | | | |
|---|-------|---------------|-----|------------------------|-----|--------------|
| | | Repeatability | | Intermediate precision | | ผลการตรวจสอบ |
| Sample | Mean | SD | CV | SD | CV | Pass |
| | COI | COI | % | COI | % | |
| HS, negative | 0.141 | 0.016 | - | 0.025 | - | Pass |
| HS, positive for anti-HIV-1 | 138 | 3.22 | 2.3 | 5.08 | 3.7 | Pass |
| HS, positive for anti-HIV-2 | 8.47 | 0.214 | 2.5 | 0.326 | 3.9 | Pass |
| HS, positive for anti-HIV-1 group O | 10.8 | 0.255 | 2.3 | 0.432 | 4.0 | Pass |
| HS, positive for HIV Ag | 3.65 | 0.084 | 2.3 | 0.141 | 3.9 | Pass |
| PreciControl HIV 1 | 0.194 | 0.017 | - | 0.022 | - | Pass |
| PreciControl HIV 2 | 19.6 | 0.404 | 2.1 | 0.707 | 3.6 | Pass |
| PreciControl HIV 3 | 62.2 | 1.50 | 2.4 | 2.38 | 3.8 | Pass |

หมายเหตุ :-

| | | | |
|--|--|-------------------------------------|--|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสียะรา | | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 3 จาก 31 หน้า | |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 | |

- Repeatability = within-run precision เป็นการประเมินความคาดเคลื่อน (error) ในระยะ เวลา short-term imprecision ทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำๆ กันภายในเวลาเดียวกัน ทำภายในห้องปฏิบัติการเพียงแห่งเดียว ผู้วิเคราะห์เพียงคนเดียว เครื่องมือที่ใช้มีเพียงเครื่องเดียวและใช้วิธีวิเคราะห์ เดียว
- Intermediate precision = within-laboratory precision/between-run เป็นการประเมินความคาดเคลื่อน (error) ในระยะเวลา long-term imprecision ทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำๆ กันเป็น เวลาติดต่อกันหลายวัน ผู้วิเคราะห์หลายคน และเครื่องมือหลายเครื่อง
- Device precision หรือ Total precision เป็นความคาดเคลื่อน (error) ที่ได้จากการคำนวณจากทั้ง repeatability (within-run precision) และ intermedated precision (between-run precision)
- COI = Cutoff index
- HS = Human serum
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

3.2. Analytical specificity

ทำการทดสอบหา cross reaction กับสิ่งส่งตรวจ 1,182 แล้วไม่พบว่ามี false positive

- Antibodies ต่อ HAV, HBV, HCV, HTLV, CMV, EBV, HSV, VZV, Toxoplasma gondii, Treponema pallidum, Borrelia, Parvovirus B19
- มี autoantibodies และ elevated titers of rheumatoid factor
- positive for Candida, E. coli, Plasmodium falciparum/vivax, Mycobacterium tuberculosis
- หลังฉีดวัคซีน against HAV, HBV, และ influenza
- from patients with monoclonal gammopathy and multiple myeloma/lymphoma


| | N | Elecys HIV combi PT assay | | Western Blot ^{e)} | Analytical specificity |
|---|------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|
| | | IR ^{f)} COI ≥ 1 | RR ^{g)} COI ≥ 1 | | |
| Specimens containing potentially interfering substances | 1182 | 1 ^{h)} | 1 | 0 | 99.92 % 95 % lower confidence limit: 99.53 % |

e) Western Blot confirmed positive/indeterminate

f) IR = initially reactive

g) RR = repeatedly reactive

h) Patients with monoclonal gammopathy: 1 out of 21

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวระรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 4 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

3.3. Clinical sensitivity


- Of 179 HIV samples from early seroconversion phase (according to CTS definition), 172 samples were found positive with the Elecsys HIV combi PT assay.
- Of 1532 samples from HIV infected patients in different stages of the disease and infected with HIV-1 group M, O and HIV-2, 1532 were found to be reactive with the Elecsys HIV combi PT assay. **The sensitivity of the Elecsys HIV combi PT assay in this study was 100 %.** The 95 % lower confidence limit was 99.76 %.

| Group | N | Reactive |
|---|-----|----------|
| HIV-1 infected persons from various stages of disease | 338 | 338 |
| Infection with HIV-1 group M (subtypes A-J) | 629 | 629 |
| Infection with HIV-1 group O | 8 | 8 |
| Infection with HIV-2 | 472 | 472 |
| HIV Ag positive specimens | 85 | 85 |

- 53 lysates of cell culture supernatants including different HIV-1 group M subtypes (A-H), HIV-1 group O, and HIV-2 were tested and found reactive in the Elecsys HIV combi PT assay.
- In 46 follow-ups of very early HIV infections, 100 out of 105 samples were detected positive with the Elecsys HIV combi PT assay.

3.4. Clinical specificity

- In a group of 7343 randomly selected blood donors from Europe and Asia the specificity of the Elecsys HIV combi PT assay was found 99.88 % (RR). The 95 % lower confidence limit was 99.77 %.
- In a group of 4103 samples from unselected daily routine, dialysis patients and pregnant women the specificity of the Elecsys HIV combi PT assay was found 99.81 % (RR). The 95 % lower confidence limit was 99.62 %.

| | | | |
|--|---|-------------------------------------|--|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 5 จาก 31 หน้า | |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 | |

| | N | Elecys HIV combi PT assay | | Western Blot ⁱ⁾ | Clinical specificity (95 % lower confidence limit) |
|---------------------------------------|------|---------------------------|---------------|----------------------------|--|
| | | IR COI ≥ 1 | RR COI ≥ 1 | | |
| Blood donors | 7343 | 13 | 11 | 1/1 | 99.88 % (99.77 %) |
| Unselected samples from daily routine | 2721 | 33 | 33 | 26 | 99.74 % (99.47 %) |
| Dialysis patients | 251 | 1 | 1 | 0 | 99.60 % (97.80 %) |
| Pregnant women | 1131 | 1 | 1 | 1 | 100 % (99.67 %) |

i) Western Blot confirmed positive/indeterminate. Samples with indeterminate WB were excluded from calculation.

3.5. Seroconversion sensitivity

Seroconversion sensitivity of the Elecys HIV combi PT assay has been shown by testing 102 commercial seroconversion panels in comparison to registered HIV combi assays or anti-HIV immunoassays and/or HIV Ag assays.

A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโอไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0)


3.6. ความไวและความจำเพาะ

ได้ทำการประเมินชุดตรวจ เอสดี ไบโอไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 ในตัวอย่างตรวจที่ทราบผลการทดสอบเอชไอวีจริง โดยหลายสถาบันการวิจัย เช่น ในเกาหลี อินเดีย เบลเยียม ฝรั่งเศส ทานซาเนีย มาเลเซีย และแอฟริกาใต้ จำนวน 4937 ราย ชุดตรวจเอสดี ไบโอไลน์ เอชไอวี – ½ 3.0 ให้ความไว 100 % (1,109/1,109) และความจำเพาะ 99.8% (3,821/3,828)

| | | ชุดตัวอย่างที่ทราบผลการทดสอบเอชไอวีจริง | | รวม |
|-------------------------------------|-------|---|----------------|------|
| | | ผลบวกต่อเอชไอวี | ผลลบต่อเอชไอวี | |
| ชุดตรวจเอสดี ไบโอไลน์ เอชไอวี ½ 3.0 | ผลบวก | 1109 | 7 | 1116 |
| | ผลลบ | 0 | 3821 | 3821 |
| | รวม | 1109 | 3828 | 4937 |

3.7. ความแม่นยำ

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งสุดท้าย

| | | | |
|--|--|-------------------------------------|--|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 6 จาก 31 หน้า | |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 | |

- ภายในระหว่างการทดสอบแต่ละครั้ง (INTRA RUN) ทำการทดสอบตัวอย่างตรวจที่มีระดับของแอนติบอดีต่อเอชไอวีแตกต่างกัน 4 ราย ทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้งโดยใช้ชุดตรวจที่ต่างรุ่นผลิต (Lot) 3 รุ่นต่อเนื่องกัน ผลการทดสอบพบว่ามีความแม่นยำมีค่าเท่ากับ 100%
- ระหว่างการทดสอบต่างครั้ง (INTER RUN) ทำการทดสอบตัวอย่างตรวจที่มีระดับของแอนติบอดีต่อเอชไอวีแตกต่างกัน 4 ราย ทำการทดสอบ 10 ครั้ง ผลการทดสอบพบว่าความแม่นยำมีค่าเท่ากับ 100%

A3 : ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2

3.8. ความจำเพาะของชุดตรวจ

ศึกษาเปรียบเทียบชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 กับชุดตรวจอื่นๆ โดยใช้ตัวอย่างซีรัม พลาสมาจากผู้ติดเชื้อในทวีปเอเชีย แอฟริกาตะวันตกและอเมริกาเหนือ จำนวนทั้งสิ้น 1,594 ตัวอย่าง

| กลุ่มศึกษา | จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดย อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยชุดทดสอบอื่นๆ |
|--|-----------------------|--|---|
| ผลลบทางซีโรโลยี | | | |
| ซีรัม | 908 | 907/908 (99.89%) | 908/908 (100.00%) |
| พลาสมา | 403 | 403/403 (100.00%) | 403/403 (100.00%) |
| สตรีตั้งครรภ์ | 58* | 57/57 (100.00%) | 57/57 (100.00%) |
| ชาวแอฟริกันตะวันตก | 49 | 48/49 (97.96%) | 48/49 (97.96%) |
| ผู้ป่วยโรคอื่นที่อาจมีสารรบกวนการทดสอบ | 176* | 173/175 (98.86%) | 174/175 (99.45%) |
| รวม | 1,594** | 1,588/1,592 (99.75%) | 1,590/1,592 (99.87%) |

*ตัวอย่าง 2 ราย ซึ่งเป็นสตรีตั้งครรภ์ 1 ราย และผู้ป่วยที่พบเชื้อ HCV อีก 1 ราย พบว่าให้ผลบวกทั้งกับชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 และกับชุดตรวจอีกชนิดที่ตรวจเปรียบเทียบกัน ซึ่งตัวอย่างทั้ง 2 รายนี้ ผลการตรวจยืนยัน โดยเวสเทิร์น บลอท ให้ผลบวกทั้งคู่


**เป็นตัวอย่างที่ได้จากอเมริกาเหนือ 456 ราย จากเอเชีย 1,089 ราย และจากแอฟริกา 49 ราย

***วิธีของชุดทดสอบอื่นๆ ที่ใช้อ้างอิงคือ การเกาะกลุ่มของอนุภาค (Particle Agglutination)

จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 3,663 ราย ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากอเมริกาเหนือ เอเชีย และแอฟริกา ชนิดซีรัมและพลาสมาที่ให้ผลลบทางซีโรโลยีจากการทดสอบด้วย อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 และชุดทดสอบอื่นๆ ตัวอย่างต่างๆ มาจากอเมริกาเหนือ เอเชีย และอีก 49 ตัวอย่างมาจาก 2118 ตัวอย่างของแอฟริกาเป็นตัวอย่างเดียวกันที่มีในตารางที่ 1 ตัวอย่างซึ่งให้ผลขัดแย้งได้ทำการทดสอบยืนยันแล้วว่าได้ผลลบด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอท และ วิธี เอชไอวี-1 พีซีอาร์

การเปรียบเทียบความจำเพาะของชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 ตามพื้นที่ภูมิศาสตร์

| พื้นที่ | จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดย อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยชุดทดสอบอื่นๆ* |
|--------------|-----------------------|--|--|
| อเมริกาเหนือ | 456 | 451/454(99.34%) | 453/454(99.78%) |

| | | | |
|--|--|-------------------------------------|--|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 7 จาก 31 หน้า | |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 | |

| | | | |
|---------|------|--------------------|--------------------|
| เอเชีย | 1089 | 1089/1089(100.00%) | 1089/1089(100.00%) |
| แอฟริกา | 2118 | 2079/2118(98.16%) | 2100/2118(99.15%) |

*วิธีของชุดทดสอบอื่นๆ ที่ใช้อ้างอิงคือ การเกาะกลุ่มของอนุภาค (Particle Agglutination), เอนไซม์อิมมูโนเอสเสย์ และเคมีลูมิเนสเซนซ์อิมมูโนเอสเสย์

ทำการทดสอบตัวอย่างเลือดครบส่วนจากประเทศไทย ที่ผลการตรวจทางซีโรโลยีของแอนติเอชไอวีให้ผลลบจำนวน 368 ตัวอย่าง ทำการตรวจโดยชุดตรวจ อลีสย ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 และตรวจควบคู่กันทั้งเลือดครบส่วนและพลาสมา ตัวอย่างกลุ่มนี้มี 39 ราย ที่เจาะเลือดทั้งจากหลอดเลือดดำและเจาะจากปลายนิ้ว

| ชนิดของตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่างที่ทำการทดสอบ | ผลการตรวจเป็นลบโดยชุดตรวจ อลีสย ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 |
|--------------------------------------|----------------------------|--|
| ซีรัม | 368 | 368/368 (100%) |
| พลาสมา | 368 | 368/368 (100%) |
| เลือดครบส่วน (เจาะจากหลอดเลือดดำ) | 368 | 368/368 (100%) |
| เลือดครบส่วน (เจาะจากปลายนิ้ว) | 39 | 39/39(100%) |

3.9 ความไวของชุดตรวจ


ศึกษาตัวอย่างซีรัมและพลาสมาที่มีแอนติบอดีต่อเอชไอวี-1 และเอชไอวี-2 จากเอเชีย และอเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้จำนวน 869 ราย ด้วยชุดตรวจ อลีสย ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 เปรียบเทียบกับชุดตรวจอื่นๆ

| กลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา | จำนวนตัวอย่างที่ทำการทดสอบ | ผลการตรวจเป็นบวกโดย ชุดตรวจ อลีสย ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 | ผลการตรวจเป็นบวกโดยชุดทดสอบอื่นๆ |
|---------------------------|----------------------------|--|----------------------------------|
| ผลบวก เอชไอวี-1 | 521* | 521/521 (100.00%) | 521/521(100.00%) |
| ผลบวก เอชไอวี-2 | 114* | 114/114 (100.00%) | 114/114 (100.00%) |
| เอชไอวี-1 สปีทียป์ เอ-จี | 222 | 222/222 (100.00%) | ไม่ได้ทดสอบ |
| เอชไอวี-1 กรุป โอ | 12 | 12/12 (100.00%) | ไม่ได้ทดสอบ |
| รวม | 869 | 869/869 (100.00%) | 635/635 (100.00%) |

*ตัวอย่างจำนวน 228 ราย เป็นตัวอย่างจากอเมริกาเหนือ ตัวอย่างจำนวน 296 ราย เป็นตัวอย่างจากเอเชีย และตัวอย่างจำนวน 111 ราย เป็นตัวอย่างจากแอฟริกา

**วิธีของชุดทดสอบอื่นๆ ที่ใช้อ้างอิงคือ การเกาะกลุ่มของอนุภาค (Particle Agglutination)

จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 1,653 ราย เป็นตัวอย่างที่ได้จากอเมริกาเหนือ เอเชีย และแอฟริกา ชนิดซีรัมและพลาสมาที่ให้ผลบวกทางซีโรโลยีจากการทดสอบด้วย อลีสย ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 และชุดทดสอบอื่นๆ ส่วนตัวอย่างต่างๆ จากอเมริกาเหนือ เอเชีย และตัวอย่าง 111 ราย จาก 1129 ตัวอย่าง ของแอฟริกา เป็น

| | | | |
|--|--|-------------------------------------|--|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสียะรา | | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 8 จาก 31 หน้า | |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 | |

ตัวอย่างเดียวกับที่มีในตารางที่ 4 ตัวอย่างที่ให้ผลชัดเจน ได้ทำการทดสอบยืนยันแล้วว่าให้ผลบวกโดยวิธี เวสเทิร์น บลอต และวิธี เอชไอวี-1 พีซีอาร์

การเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจ อเลียว ดิเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 ตามพื้นที่ภูมิศาสตร์

| พื้นที่ | จำนวนตัวอย่าง ที่ทดสอบ | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล ลบ โดย อเลียว ดิเทอร์มิน เอชไอวี- 1/2 | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล ลบ โดยชุดทดสอบ อื่นๆ** |
|--------------|---------------------------|---|--|
| อเมริกาเหนือ | 228 | 228/228 (100%) | 228/228 (100%) |
| เอเชีย | 296 | 296/296 (100%) | 296/296 (100%) |
| แอฟริกา | 1129 | 1128*/1129(99.91%) | 1129/1129(100%) |

*ตัวอย่างจำนวน 1 ราย ที่ให้ผลลบโดย อเลียว ดิเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 ได้ทดสอบยืนยันแล้วว่าให้ผลบวกโดยเอชไอวี-1 พีซีอาร์

**วิธีของชุดทดสอบอื่นๆ ที่ใช้อ้างอิงคือ การเกาะกลุ่มของอนุภาค (Particle Agglutination) เอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ และเคมีลูมิเนสเซนซ์อิมมูโนแอสเสย์

ทำการศึกษาดูตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ผลการตรวจทางซีโรโลยีให้ผลบวกแอนติเอชไอวีจำนวน 102 ราย จากประเทศไทย และศึกษาเปรียบเทียบระหว่างซีรัมและพลาสมาที่เจาะเทียบกัน (Paired Serum and Plasma Specimens) ด้วยชุดตรวจ อเลียว ดิเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 ตัวอย่างเลือดรวม 32 ราย เจาะเลือดทั้งจากหลอดเลือดดำและปลายนิ้ว

เปรียบเทียบความไวของชุดตรวจ อเลียว ดิเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 ในตัวอย่างผลบวกทางซีโรโลยีต่อเอชไอวีทั้งเลือดครบส่วน และซีรัมกับพลาสมาที่เจาะเทียบกัน

| ชนิดของตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่างที่ทำการทดสอบ | ผลการตรวจเป็นลบโดยชุด ตรวจ อเลียว ดิเทอร์มิน เอชไอวี- 1/2 |
|--------------------------------------|----------------------------|---|
| ซีรัม | 102 | 102/102 (100%) |
| พลาสมา | 102 | 102/102 (100%) |
| เลือดครบส่วน (เจาะจากหลอดเลือดดำ) | 102 | 102/102 (100%) |
| เลือดครบส่วน (เจาะจากปลายนิ้ว) | 32 | 32/32 (100%) |

4. ชนิดตัวอย่าง (type of sample)


A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)

4.1. Serum จากหลอดเก็บมาตรฐาน ไม่ควรใช้หลอดที่มี separating gel เพราะ gel อาจมีการฟุ้งออกมาปนในส่วน of serum

4.2. Plasma ใช้ : Li-heparin, Na-heparin, K2-EDTA, K3-EDTA, CPDA, ACD และ sodium citrate plasma จากหลอดเก็บมาตรฐาน

4.3. ความคงตัวของตัวอย่าง

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสียะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 9 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

| ชนิดตัวอย่าง | อุณหภูมิ | ความคงตัว |
|--|----------------|--|
| ตัวอย่างที่เก็บจาก living patients และ donor specimens | 20-25°C | 7 วัน |
| | 2-8°C | 4 สัปดาห์ |
| | (-15)-(-25) °C | 3 เดือน แช่แข็งแล้วละลายใช้ซ้ำได้ 5 ครั้ง |

4.4. ข้อควรระวังเกี่ยวกับความคงทนของตัวอย่าง มีดังนี้

- ถ้าสิ่งส่งตรวจมีตะกอน ต้องปั่นแยกตะกอนก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์
- ห้ามนำสิ่งส่งตรวจไปผ่านความร้อน
- ห้ามยืดอายุการเก็บสิ่งส่งตรวจด้วย Azide
- สิ่งส่งตรวจ Serum/Plasma, calibrator และ control ทุกชนิดต้องมีอุณหภูมิ 20-25 °C ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์
- เพื่อป้องกันการระเหยของสิ่งตัวอย่าง calibrator และ control ภายในเครื่อง ควรตรวจวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมง
- ในกรณีที่ใช้ Primary tube เข้าเครื่อง ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต tube อย่างเคร่งครัด
- ในกรณีที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิดเหลว อาจเกิด Dilution effect และส่งผลกระทบต่อผลคนไขในแต่ละราย เพื่อลด Dilution effect ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต tube อย่างเคร่งครัด


A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโอไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0)

4.5. ตัวอย่างตรวจที่เป็นเลือดครบส่วน

- เลือดครบส่วนที่เก็บจากการเจาะหลอดเลือดดำหรือเจาะจากปลายนิ้ว ต้องเก็บอย่างสะอาดและถูกวิธีไร้เชื้อ (Aseptic technique) โดยหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง
- เลือดครบส่วนที่เก็บจากการเจาะปลายนิ้วควรทำการทดสอบที่ทันที
- เลือดครบส่วนที่เก็บจากการเจาะหลอดเลือดดำที่ใส่สารกันเลือดแข็ง หากไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันทีควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C ได้นาน 3 วัน
- สารกันเลือดแข็งที่สามารถใช้ได้กับตัวอย่างตรวจที่เป็นเลือดครบส่วน ได้แก่ Heparin, EDTA, Sodium citrate
- ไม่ควรเก็บตัวอย่างตรวจที่เป็นเลือดครบส่วนโดยวิธีแช่แข็ง

4.6. ตัวอย่างตรวจที่เป็น Serum หรือ Plasma

- Serum หรือ Plasma ที่เก็บจากการเจาะหลอดเลือดดำต้องเก็บอย่างสะอาดและถูกวิธีไร้เชื้อ (Aseptic technique) และควร Serum หรือ Plasma ออกจากเลือดโดยเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตก
- Serum หรือ Plasma หากไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันที ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C ในกรณีที่ต้องการเก็บไว้นานกว่า 3 วัน ควรเก็บด้วยวิธีแช่แข็ง และควรนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการทดสอบ

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 10 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

- ตัวอย่างตรวจ Serum หรือ Plasma ที่มีตะกอนอาจขัดขวางการทดสอบ ควรทำการปั่นแยกให้ใสก่อนการทดสอบ

A3 : ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2

4.7. Serum หรือ Plasma และ whole blood ที่เก็บจากหลอดเลือดดำ

- Serum หรือ Plasma และ whole blood จากการเจาะหลอดเลือดดำ ต้องเก็บอย่างสะอาด และถูกวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technigue) โดยระวังไม่ให้มีเม็ดเลือดแดงแตก
- การเก็บตัวอย่างเลือดครบส่วนและพลาสมาจากหลอดเลือดดำ ต้องใช้หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่บรรจุสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA

4.8. เลือดครบส่วนจากปลายนิ้ว

- สามารถใช้หลอด EDTA หรือ Capillary tube ในการเก็บตัวอย่างตรวจก่อนการเจาะเก็บเลือดจากปลายนิ้ว เตรียมนำหลอด Capillary tube ออกมาวางไว้บนพื้นแห้งและสะอาด
- สำหรับผู้ใหญ่หรือเด็กที่อายุเกิน 1 ปี เลือกเจาะบนนิ้วกลาง นิ้วนาง หรือนิ้วชี้ (ที่มีผิวหนังบางกว่าที่อื่น) ใช้นิ้วมือที่จะเจาะเลือดด้วยผ้าร้อนหรือแช่น้ำอุ่นเพื่อเพิ่มการไหลเวียนของเลือด
- ใช้แอลกอฮอล์ทำความสะอาดปลายนิ้ว แล้วปล่อยให้แห้งและหายใจเข้าออก
- ใช้ใบมีดใหม่เฉพาะบุคคล แกะใบมีดและจรดใบมีดลงที่ส่วนกลางของปลายนิ้ว และเจาะลงบนผิวหนัง ทั้งใบมีดเจาะเลือดลงในที่ทิ้งขยะติดเชื้อสำหรับของมีคม
- เช็ดเลือดหยดแรกด้วยสำลีแห้งที่ปราศจากเชื้อ
- จับมือไว้ให้หายใจอยู่ในระดับต่ำกว่าข้อศอก บีบที่โคนนิ้วเบาๆเป็นระยะหลายๆครั้ง และปล่อยให้เลือด Capillary ที่หยดเลือดบนปลายนิ้ว ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

4.9. การเก็บรักษาตัวอย่าง


- ตัวอย่างตรวจ Serum หรือ Plasma ถ้าทำการตรวจภายใน 7 วันหลังการเจาะเลือด ควรเก็บที่ 2-8 °C แต่ถ้าช้ากว่า 7 วันควรเก็บโดยการแช่แข็ง (-20°C หรือต่ำกว่า)
- เลือดครบส่วน (whole blood) ที่เจาะจากหลอดเลือดดำ ถ้าทำการตรวจภายใน 7 วัน หลังการเจาะเลือด ควรเก็บที่ 2-8°C ห้ามเก็บเลือดครบส่วนโดยวิธีแช่แข็ง
- เลือดครบส่วนที่เจาะจากปลายนิ้ว ควรทำการตรวจทันที

5. การเตรียมผู้ป่วย (patient preparation)

การตรวจ HIV (Anti-HIV, HIV Ag) ไม่จำเป็นต้องอดอาหารก่อนเจาะเก็บตัวอย่างเลือด แต่ถึงแม้ว่าเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดหรืออาหารที่รับประทานจะไม่มีผลกระทบต่อผลการตรวจ HIV แต่ความขุ่นของไขมัน (chylomicrons) ในอาหารมีผลกระทบต่อวิธีที่ใช้วิเคราะห์รายการทดสอบอื่นๆ ที่ใช้ตัวอย่างตรวจร่วมกับ HIV การอดอาหาร 8-16 ชั่วโมง จะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้องน่าเชื่อถือกว่า

6. ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง (type of container and additives)

6.1. ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่งซึ่งใช้บรรจุตัวอย่างเริ่มต้นที่ส่งตรวจหา HIV ได้แก่

| | | | |
|--|--|-------------------------------------|--|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 11 จาก 31 หน้า | |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 | |

| ชุดทดสอบ | HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2) (A1) | SD BIOLINE HIV-1/2 3.0 (A2) | ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 (A3) |
|---|---|-----------------------------|--|
| 1. หลอดบรรจุเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (Serum tube : จุกแดง) | ✓ | ✓ | ✓ |
| 2. หลอดบรรจุเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (Serum Gel tube : จุกเหลือง) | ✗ | ✓ | ✗ |
| 3. Lithium heparin Blood collection tube (จุกเขียว) | ✓ | ✓ | ✗ |
| 4. EDTA Blood collection tube (จุกม่วง) | ✓ | ✓ | ✓ |
| 5. Sodium citrate Blood collection tube (จุกฟ้า) | ✓ | ✓ | ✗ |
| 6. Heparinized capillary tubes | ✗ | ✓ | ✓ |
| 7. EDTA capillary tubes | ✗ | ✓ | ✓ |


- หมายเหตุ - หลอดบรรจุเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งซึ่งมีหรือไม่มีสารกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด เช่น Clot activator Blood Collection tube (ฝาปิดหลอดสีแดง) ขนาดบรรจุ 3-4 mL ใช้ในงานประจำวัน สำหรับชุดทดสอบ A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2) และ A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโอบีไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0)
- หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA Blood Collection tube (ฝาปิดหลอดสีม่วง) มี K₂-EDTA หรือ K₃-EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ขนาดบรรจุ 2-3 mL สำหรับชุดทดสอบ A3 : ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2

6.2. ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่งซึ่งใช้บรรจุตัวอย่างนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์

- 6.2.1. หลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้นขนาด 13x75 mm. ในข้อ 6.1 ที่ปั่นแยก serum หรือ Plasma แล้ว
- 6.2.2. Hitachi cup เป็น sample cup ที่ใช้บรรจุตัวอย่างตรวจที่แบ่งมาจากหลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้น ต้องการปริมาณตัวอย่างไม่น้อยกว่า sample dead volume (100 ไมโครลิตร)
- 6.2.3. Hitachi micro cup เป็น Sample cup ที่ใช้บรรจุตัวอย่างที่แบ่งมาจากหลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้น ต้องการปริมาณตัวอย่างไม่น้อยกว่า sample dead volume (50 ไมโครลิตร)
- 6.2.4. หลอดชนิดไม่มีสารกันเลือดแข็ง (Plain tube) ใช้บรรจุตัวอย่างที่แบ่งมาจากหลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้น ต้องการปริมาณตัวอย่างไม่น้อยกว่า sample dead volume (500 ไมโครลิตร)

7. เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี (required equipment and reagents)

A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 12 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

- 7.1. เครื่องตรวจวิเคราะห์หัตโนมิติ : ใช้เครื่อง cobas e 601 ซึ่งเชื่อมต่อกับเครื่อง cobas c 501, Control unit และ Core unit เป็นระบบวิเคราะห์ที่เรียกชื่อว่า cobas 6000 analyzer series ทุกส่วนเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Roche Diagnostic ประเทศเยอรมัน (A1)
- 7.2. เครื่องปั่น(Centrifuge) : ใช้สำหรับปั่นแยก Serum/Plasma ที่ความเร็วรอบในการปั่น 3,500 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที หลังจากตั้งตัวอย่างเลือดเริ่มต้นทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีก่อนปั่น
- 7.3. น้ำยาตรวจวิเคราะห์ : ใช้น้ำยา Elecsys HIV Combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2) Cat. No. 05390095 190 เป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปพร้อมใช้งาน(ready-to-use) บรรจุในรูปแบบ Reagent rackpack ติดฉลาก “HIV Combi PT” ผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Roche โดย 1 ชุดตรวจได้ 100 Tests

7.3.1. ความคงทนและวิธีการเก็บรักษา HIV Combi PT reagent rackpack

- 7.3.1.1. เก็บน้ำยาตั้งขวดขึ้นเสมอ เมื่อยังไม่เปิดใช้งาน
- 7.3.1.2. เก็บน้ำยาที่ 2-8 °C จะมีความคงตัวจนถึงวันสิ้นอายุที่ระบุไว้ข้างภาชนะบรรจุน้ำยา
- 7.3.1.3. หลังจากเปิดใช้แล้ว น้ำยามีความคงทนที่ 2-8 °C นาน 12 สัปดาห์
- 7.3.1.4. เมื่อน้ำยาอยู่ในเครื่อง cobas e 601

- มีความคงทนนาน 28 วัน ถ้าวางต่อเนื่องในเครื่อง cobas e 601 ที่ 20-25 °C ตลอดเวลา


7.3.2. สารเคมีใน HIV Coombi PT reagent rackpack (M, R0, R1, R2) มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

- M Streptavidin-coated microparticles (transparent cap), 1 bottle, 6.5 mL: Streptavidin-coated microparticles 0.72 mg/mL; preservative.
- R0 MES buffer 50 mmol/L, pH 5.5; 1.5 % Nonidet P40; preservative (white cap), 1 bottle, 4 mL.
- R1 Anti-p24~, HIV-1/-2-specific recombinant antigens (E. coli)~, HIV-1/-2-specific peptides~biotin (gray cap), 1 bottle, 7 mL: Biotinylated monoclonal anti-p24 antibodies (mouse), biotinylated HIV-1/-2-specific recombinant antigens (E. coli), biotinylated HIV-1/-2 specific peptides > 1.3 mg/L; TRIS buffer 50 mmol/L, pH 7.5 ; preservative.
- R2 Anti-p24~, HIV-1/-2-specific recombinant antigens (E. coli)~, HIV-1/-2-specific peptides~Ru(bpy) (black cap), 1 bottle, 7 mL: Monoclonal anti-p24 antibodies (mouse), HIV-1/-2 specific recombinant antigens, HIV-1/-2 specific peptides labeled with ruthenium complex > 1.5 mg/L; TRIS buffer 50 mmol/L, pH 7.5; preservative.

7.4. สารมาตรฐาน :-

7.4.1. ใช้ Calibrators 2 ระดับ ดังต่อไปนี้

HIVCOMPT Cal1 Negative calibrator (white cap), 2 bottles (lyophilized) for 1.0 mL each: Human serum, non reactive for anti-HIV-1 and anti-HIV-2.

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 13 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

HIVCOMPT Cal2 Positive calibrator (black cap), 2 bottles (lyophilized) for 1.0 mL each: Anti-HIV-1 positive human serum (inactivated) in human serum negative for anti-HIV-1 and anti-HIV-2.

7.4.2. ความคงทนและการเก็บรักษา calibrators

7.4.2.1. เก็บรักษา calibrator ใน snap-cap bottles (CalSet Vials) ให้ตั้งขวดขึ้นเสมอเพื่อป้องกัน calibrator solution เกาะที่ฝาปิด (snap-cap)

7.4.2.2. ให้ตั้งขวดขึ้นเสมอเพื่อป้องกัน calibrator solution เกาะที่ฝาปิด(snap-cap)

7.4.2.3. เก็บรักษาที่ 2-8 °C จะมีความคงตัวจนถึงวันสิ้นอายุที่ระบุไว้ข้างขวดบรรจุ calibrator

7.4.2.4. หลังจากเปิดใช้แล้ว มีความคงทนที่ 2-8 °C นาน 8 สัปดาห์

7.4.2.5. เมื่อนำออกมาจากตู้เย็นและวางอยู่ในเครื่อง cobas e 601 ที่ 20-25 °C แล้ว จะใช้ได้เพียงครั้งเดียว ให้ถือว่าหมดอายุทันทีหลังจากใช้งานแล้ว

7.5. สารควบคุมคุณภาพ : ใช้ PreciControl HIV Gen II, for 2 x 2.0 mL

7.6. อุปกรณ์ประกอบการทดสอบ(Accessories for **cobas e 601**)

7.6.1. ProCell M (system buffer) มีสาร TPA ที่ใช้ในขั้นตอนการวัดในหลักการ ECL

7.6.2. CleanCell M (measuring cell cleaning solution) ใช้ล้าง measuring cell หลังการวัด

7.6.3. PC/CC-cups (prewarm ProCell M and CleanCell M before use)

7.6.4. ProbeWash M (cleaning solution for run finalization and rinsing during reagent change) ใช้ล้าง Reagent probe ในบางการทดสอบ เพื่อป้องกัน carry over

7.6.5. AssayTip/AssayCup combimagazine M

7.6.6. WasteLiner (Waste bags)

7.6.7. SysClean Adapter M

7.6.8. Elecsys SysClean

7.6.9. Deionized water

7.6.10. Elecsys 2010 Assay cup (reaction vessels)

7.6.11. Elecsys 2010 Assay Tip (pipette tip)

7.6.12. Hitachi cup สำหรับใส่ตัวอย่าง กรณีไม่สามารถใช้ Primary tube


7.6.13. Rack มี 5 ชนิด ได้แก่ Rack สีดำ สำหรับวาง calibrator, Rack สีขาว สำหรับวาง control, Rack สีเทา สำหรับวางตัวอย่างที่เป็น Routine, Rack สีแดง สำหรับวางตัวอย่างที่เป็น STAT และ Rack สีเขียว ใช้เพื่อบำรุงรักษาเครื่อง

A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโออนไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0)

7.7. ตลับชุดทดสอบ เอสดี ไบโออนไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0) ที่แยกบรรจุในซองพอยล์ และมีสารดูดความชื้น บรรจุ 30 ชุดทดสอบ

7.8. น้ำยาเจือจาง (แอสเสย์ ไดลูเอนท์) ซึ่งมีสารประกอบคือ 50 มิลลิโมล ไตสไฮโดรคลอไรด์, บัฟเฟอร์ และ โซเดียมเอไซด์ (0.02% w/w) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 14 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

A3 : ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2

- 7.9 ชุดทดสอบ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 สำหรับตัวอย่างที่เป็นซีรัม หรือพลาสมา 100 การทดสอบ เคลือบด้วยเอชไอวี-1/2 รีคอมบิแนนท์แอนติเจน ร่วมกับเพปไทด์สังเคราะห์
- 7.10 เซสต์บัฟเฟอร์ 1 ขวด (2.5 มล.) เตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

8. สิ่งแวดล้อมและการควบคุมความปลอดภัย (environmental and safety controls)

- 8.1. ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น
- 8.2. ใช้ความระมัดระวังการปฏิบัติงานตามหลักสากล
- 8.3. ต้องสวมถุงมืออย่างขณะปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่อาจปนเปื้อนในตัวอย่างตรวจ เช่น HIV, HBsAg เป็นต้น
- 8.4. ต้องสวมเสื้อคลุมขณะปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันการหกเลอะเทอะของตัวอย่างตรวจและน้ำยาตรวจวิเคราะห์

9. ขั้นตอนการสอบเทียบ (calibration procedures)

A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)

9.1. ข้อกำหนดในการสอบเทียบ

9.1.1. ทำการสอบเทียบน้ำยา **Elecsys HIV Combi PT** (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2) ที่ใช้งานร่วมกับเครื่องตรวจวิเคราะห์ cobas e 601 เมื่อเปิดใช้งานน้ำยา **Elecsys HIV Combi PT** (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2) ครั้งแรก หรือน้ำยาเปลี่ยนรุ่นการผลิต(Lot) ใหม่ และทำการสอบเทียบซ้ำอีกครั้ง(Renewed-calibration) เมื่อ


- ครบระยะเวลา 1 เดือน (28 วัน) เมื่อใช้น้ำยา lot. เดียวกัน
- ครบระยะเวลา 7 วัน (เมื่อใช้น้ำยาขวดเดียวกันบนเครื่อง)
- ตามความต้องการ เช่น มีการทำ preventive maintenance รอบใหญ่หรือมีการเปลี่ยนชิ้นส่วนอะไหล่ที่มีผลกระทบต่อค่าการวัด และเมื่อผล IQC และหรือ EQA/PT บ่งชี้ว่ามี systematic error ที่ต้องแก้ไขปัญหาดังกล่าวด้วยการสอบเทียบใหม่(re-calibration)

9.1.2. การตรวจวัดค่าสารสอบเทียบเพื่อสร้าง Standard curve โดยใช้สารมาตรฐานจำนวน 2 ระดับ ทำซ้ำอัตโนมัติระดับละ 2 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย สารมาตรฐานที่ใช้สอบเทียบต้องไม่หมดอายุ ประกอบด้วย

1) HIVCOMPT Cal1 Negative calibrator (white cap), 2 bottles (lyophilized) for 1.0 mL

2) HIVCOMPT Cal2 Positive calibrator (black cap), 2 bottles (lyophilized) for 1.0 mL

ในกล่องน้ำยาทุกกล่องจะมี HIV Combi PT cal1 และ cal2 พร้อมกับมีแถบ barcode มาให้ ช่วงค่า electrochemiluminescence signals (counts) ของ Negative calibrator (Cal1) สำหรับเครื่อง cobas e 601 อยู่ระหว่าง 550-2200 ส่วน positive calibrator (Cal2) สำหรับเครื่อง cobas e 601 อยู่ระหว่าง 14000-70000 ค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของน้ำยาแต่ละรุ่นการผลิต (lot-specific) จะถูกใส่ข้อมูลไว้ในแถบรหัส (barcode) สารมาตรฐานเป็นแบบสำเร็จรูปพร้อมใช้งาน

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 15 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

9.2. วิธีการสอบเทียบ

- 9.2.1. นำสารสอบเทียบที่บรรจุอยู่ใน snap-cap bottles(CalSet Vials) ออกมาจากตู้เย็น ก่อนใช้ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (อุณหภูมิ 20 - 28 องศาเซลเซียส) ไม่น้อยกว่า 15 นาที
- 9.2.2. calibrate น้ำยา HIV Combi PT โดยการปฏิบัติตามหัวข้อ “การทำ calibration” ในคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator s manual cobas 6000 analyzer series(MN-LAB-065)

10. ขั้นตอนของกระบวนการ (procedural steps)

A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)


10.1. เตรียมเครื่องมือ น้ำยา และตัวอย่างตรวจ ก่อนการตรวจวิเคราะห์

10.1.1. วิธีการเตรียมเครื่องมือ อุปกรณ์

- 10.1.1.1. เครื่องตรวจวิเคราะห์จะทำ Daily begin เวลา 05.00 น. โดยอัตโนมัติ
- 10.1.1.2. ลงชื่อเข้า(Operator ID) และรหัสผ่าน(Password) เพื่อเข้าใช้งานระบบ (logon)เครื่องตรวจวิเคราะห์ cobas 6000
- 10.1.1.3. ตรวจสอบปริมาณและเติมน้ำยา Auxiliary ได้แก่ ProCell M, CleanCell M และ PleClean M ซึ่งทำได้ทั้งในขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ Standby และ Operation ถ้าน้ำยาในขวดที่ใช้งานอยู่หมด จะมีไฟกระพริบเหนือขวด ให้ใส่น้ำยาขวดใหม่เข้าไปแทน แล้วกดปุ่มไฟที่กระพริบอยู่เหนือขวดน้ำยาที่เปลี่ยนเพื่อ update ข้อมูลปริมาณน้ำยาในเครื่อง สำหรับน้ำยา PleClean M ขวดใหม่ที่ใส่เข้าไปแทนขวดทั้งหมด ให้คล้ายเกลียวฝาน้ำยาเล็กน้อย
- 10.1.1.4. ตรวจสอบปริมาณและเติมน้ำยา Probe Wash M ทำได้ในขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ Standby เท่านั้น
- 10.1.1.5. เติม combi Rack (Assay Tip และ Assay Cup และทิ้งส่วนที่หมดแล้ว ซึ่งทำได้ทั้งในขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ Standby และ Operation ตอนไฟแสดงสถานะที่อยู่ด้านบนเป็นไฟติดนิ่งเท่านั้น
- 10.1.1.6. เปลี่ยน Solid waste containerซึ่งทำได้ทั้งในขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ Standby และ Operation ตอนไฟแสดงสถานะที่อยู่ด้านบนเป็นไฟติดนิ่งเท่านั้น

10.1.2. วิธีการเตรียมน้ำยาวิเคราะห์ (reagent preparation)

- 10.1.2.1. นำ HIV Combi PT reagent pack ออกจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิห้อง เปิดฝาน้ำยาและตรวจสอบว่าไม่มีฟองอากาศในน้ำยาทั้งสามขวด แล้วจึงปิดฝาโดยไม่ต้องกดให้แน่น
- 10.1.2.2. เขียนวันเปิดใช้บน HIV Combi PT reagent pack ก่อนนำเข้าเครื่อง และลงบันทึกการเปิดใช้น้ำยาแต่ละ Cassette ในแบบบันทึกการนำออกมาใช้งานน้ำยา สารมาตรฐาน วัสดุอ้างอิง สารควบคุม และสิ่งอุปกรณ์อื่นๆ (FM-LAB- 187)
- 10.1.2.3. เมื่อเครื่องอยู่ในสถานะ Stand by ให้เปิดฝา Reagent disk ออก แล้ววาง HIV Combi PT reagent pack ลงใน reagent disk โดยหันขวดสีขาวอยู่ชิดขอบนอก

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 16 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

10.1.2.4. เมื่อเติมน้ำยาครบแล้วให้ปิดฝา Reagent disk เครื่องจะ Register น้ำยาโดยอัตโนมัติ ระหว่างที่เครื่อง register น้ำยายังไม่เสร็จ ห้ามเปิดฝา Reagent disk หรือดึง magazine drawer ออกมาโดยเด็ดขาด

10.1.3 การเตรียมตัวอย่างตรวจ

10.1.3.1 สิ่งส่งตรวจต้องไม่อยู่ในลักษณะเข้าเกณฑ์ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ

10.1.3.2 สิ่งส่งตรวจมีสารรบกวนปฏิกิริยาได้ไม่เกินตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 13. สารรบกวนการทดสอบ

10.1.3.3 เมื่อปั่นแยกสิ่งส่งตรวจ Serum/Plasma แล้ว ที่ด้านบนผิวของสิ่งส่งตรวจต้องไม่มีฟองอากาศหรือก้อนไฟบรินลอยอยู่ และส่วนที่เป็น Serum/Plasma ควรมีปริมาตรอย่างน้อย 500 μ L

10.2 ถ้ายังไม่มี การสอบเทียบน้ำยา HIV Combi PT Lot ที่ใช้งานอยู่ ให้ดำเนินการตามข้อ 9.

10.3 ถ้ายังไม่มี การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพในรอบวันนั้น ให้ดำเนินการตามวิธีการในข้อ 11.

10.4 นำตัวอย่างผู้ป่วยเข้าเครื่อง cobas e 601 ผ่าน core unit ของเครื่อง cobas 6000 analyzer series โดยสามารถใช้ Primary tube ขนาด 13x75 mm. ที่มีตัวอย่างไม่น้อยกว่า 500 ไมโครลิตร (sample dead volume 500 μ L) วางบน Rack สีเทา(กรณีไม่เร่งด่วน)หรือ Rack สีแดง(กรณีต้องการผลด่วน) หรือใช้ Automatic pipette ดูดตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 ไมโครลิตร (sample dead volume 100 μ L) ใส่ใน Sample cup (Hitachi cup) วางบน Rack

10.5 สั่งทำการตรวจวิเคราะห์และเรียกดูผลตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator's manual cobas 6000 analyzer series(MN-LAB-065) โดยเครื่อง cobas e 601 จะทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบอัตโนมัติ ตาม test-specific parameters ที่กำหนดไว้ใน reagent barcode

10.6 รายงานผล เป็น reactive หรือ non-reactive พร้อมแสดงค่า cutoff-index (COI; signal sample/cutoff).

A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโโอลิน เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV 1/2 3.0)

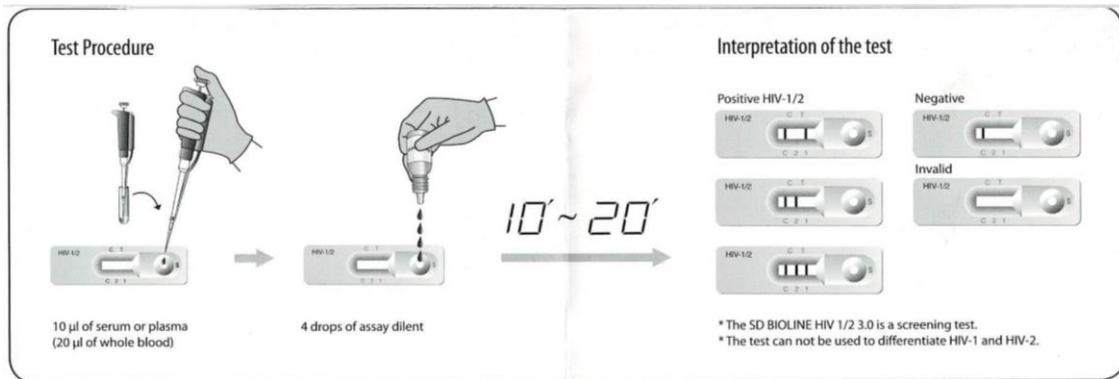
10.7 นำกลับทดสอบออกจากช่องฟอยล์บรรจุ วางบนพื้นเรียบและแห้งสนิท

10.8 ทำการทดสอบโดยหยด Serum หรือ Plasma ปริมาตร 10 μ L. (หรือ 20 ไมโครลิตรสำหรับเลือดครบส่วน) ลงในส่วนสำหรับหยดตัวอย่างตรวจ (S) แล้วหยดน้ำยาเจือจาง 4 หยด (ประมาณ 120 ไมโครลิตร) ตามลงไป และเริ่มจับเวลา

10.9 ขณะปฏิกิริยาเริ่มเกิดขึ้นจำสังเกตเห็นสารสีม่วงเข้มเคลื่อนที่ผ่านมายังช่องอ่านปฏิกิริยาตรงกลางของถลับทดสอบ

10.10 อ่านผลการทดสอบภายใน 10-20 นาที เริ่มจับเวลาหลังจากหยดน้ำยา อ่านผลหลังจาก 10 นาที แต่ไม่เกิน 20 นาที

ข้อควรระวัง หากไม่สามารถอ่านผลที่ 10 นาทีได้เนื่องจากสีพื้นของชุดตรวจยังเข้มอยู่ให้อ่านผลการทดสอบที่เวลา 20 นาที อย่างไรก็ตามเพื่อป้องกันการแปลผลการทดสอบที่ผิดพลาด ไม่ควรอ่านผลการทดสอบหลังเวลา 20 นาทีแล้ว

**A3 : ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอรัมีน เอชไอวี-1/2**

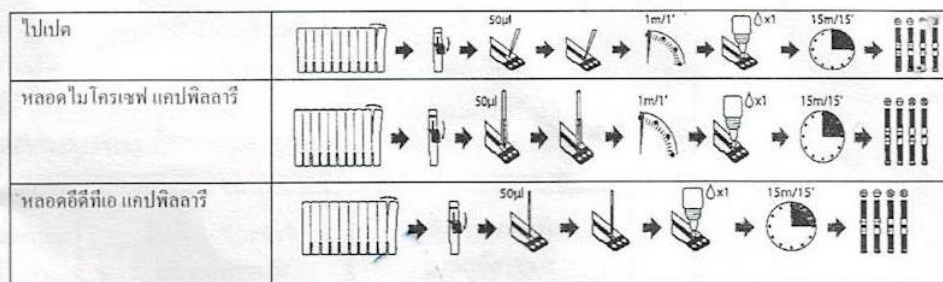
10.11 แบ่งแถบทดสอบตามจำนวนที่ต้องการ โดยหักตามรอยปรุที่แผ่นทดสอบซึ่งมี 10 แถบย่อย การแบ่งแถบทดสอบควรเริ่มหักจากด้านขวาของแผ่นทดสอบ เพื่อให้หมายเลขรุ่นการผลิตซึ่งปรากฏอยู่ทางด้านซ้ายของแผ่นทดสอบยังคงอยู่

10.12 แกะกระดาษตะกั่วที่หุ้มแถบทดสอบออก

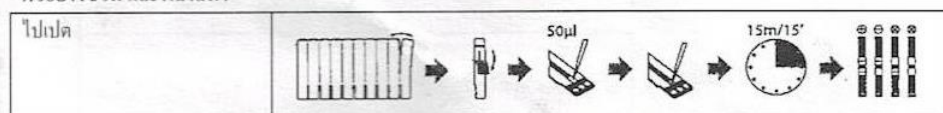
10.13 สำหรับซีรัมหรือพลาสมา เติมตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร หยดลงบริเวณสำหรับหยดตัวอย่างตรวจ (ตรงส่วนที่มีเครื่องหมายลูกศร) ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วอ่านผลการทดสอบ

10.14 สำหรับตัวอย่างที่เป็นเลือดครบส่วน (เจาะจากปลายนิ้ว) เติมตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร (โดยหลอดอิตีทีเอแคปพิลลารี) หยดลงบริเวณสำหรับหยดตัวอย่างตรวจ (ตรงส่วนที่มีเครื่องหมายลูกศร) จากนั้น รอให้เลือดซึมลงไปในแผ่นซับจนหมด จากนั้นหยดเซตบัฟเฟอร์ 1 หยดลงตรงส่วนที่ใส่ตัวอย่าง ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วอ่านผลการทดสอบ

**ภาพแสดงการทดสอบ
ตัวอย่างเลือดครบส่วน**




ตัวอย่างซีรัม และพลาสมา

**11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ (quality control procedures)**

A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)

11.1 ข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพ

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด


| | | |
|--|--|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 18 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

ให้อ้างอิงรายละเอียดจากระเบียบปฏิบัติงานเรื่องการสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21)

- 11.1.1 Internal Quality Control ที่ใช้ Elecsys PreciControl HIV Gen II ประกอบด้วย Control 1 (PC HIV1) Control 2 (PC HIV2) และ Control 3 (PC HIV3) ค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของน้ำยาแต่ละรุ่นการผลิต (lot-specific) จะถูกใส่ข้อมูลไว้ในแถบรหัส (barcode card และ barcode transfer sheet) ผลการควบคุมคุณภาพต้องอยู่ในช่วงที่กำหนด ผลการทดสอบของผู้ป่วยจึงจะเชื่อถือได้
- 11.1.2 ไม่ต้องมีขั้นตอนในการ download ข้อมูล lot ของคอนโทรล เนื่องจากเครื่อง cobas e 601 สามารถอ่านข้อมูลจาก barcode ของ control ได้ ผลการควบคุมคุณภาพถูกบันทึกไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ที่เป็น Control unit ในเมนู Control และมีโปรแกรม TIQCon ช่วยบันทึกและประมวลผลข้อมูลการควบคุมคุณภาพอีกทางหนึ่งด้วย
- 11.1.3 การเตรียมตัวอย่าง Internal quality control
- 11.1.3.1 สารควบคุมคุณภาพ Elecsys PreciControl HIV Gen II เป็นแบบพร้อมใช้งาน และออกแบบขวดที่บรรจุมาให้เข้ากับระบบที่ใช้
- 11.1.3.2 สารควบคุมคุณภาพ ควรตั้งทิ้งไว้ในเครื่องวิเคราะห์ในระหว่างการปฏิบัติงานควบคุมคุณภาพเท่านั้น หลังการใช้งาน ให้ปิดฝาขวดทันที และเก็บในแนวตั้งที่ 2-8 องศาเซลเซียส
- 11.1.3.3 เนื่องจากอาจเกิดผลกระทบจากการระเหยได้ จึงไม่ควรทำการควบคุมคุณภาพโดยใช้สารควบคุมขวดเดียวกัน **เกินกว่า 7 ครั้ง**
- 11.1.4 ให้ทำการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมควบคุมคุณภาพอย่างน้อยวันละ 1 ครั้ง ครบทุกระดับก่อนหรือพร้อมกันไปกับการตรวจตัวอย่างของผู้ป่วยรายแรกของวันนั้นเฉพาะในวันที่มีการตรวจวิเคราะห์

11.2 วิธีการควบคุมคุณภาพ

- 11.2.1 ให้นำ PC HIV 1, PC HIV 2 และ PC HIV 3 ออกมาจากตู้เย็นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (อุณหภูมิ 20 - 28 องศาเซลเซียส) ไม่น้อยกว่า 15 นาที กลับขวดไปมาเบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างของสารควบคุมคุณภาพเป็นเนื้อเดียวกันก่อนการนำเข้าเครื่อง
- 11.2.2 สั่งให้เครื่องทำ control โดยปฏิบัติตามหัวข้อ “การทำ Control” ในคู่มือปฏิบัติงาน Operator s manual cobas 6000 analyzer series(MN-LAB-065)
- 11.2.3 ติดตามตรวจสอบผล IQC ของการทดสอบ HIV ด้วยกฎการควบคุมคุณภาพ(control rule) เนื่องการทดสอบ HIV เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ(Qualitative) ที่สามารถอ่านผลเป็นเชิงกึ่งปริมาณ(Semi-Quantitative) ต้องพิจารณาความเหมาะสมของการประยุกต์ใช้กฎการควบคุมต่างๆ จึงกำหนดระดับและกฎเกณฑ์ของการติดตามเพื่อควบคุมคุณภาพการทดสอบ HIV ดังต่อไปนี้
- 11.2.3.1 ระดับจับตามอง(warning Limit) : โดยใช้กฎ $\pm 2SD$
- 11.2.3.2 ระดับที่ต้องปฏิบัติการแก้ไข(Action Limit) : โดยใช้กฎ $\pm 3SD, 22S$
- เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 19 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

11.2.3.3 Shift and Trend :-

- Shift หมายถึง การที่ผล QC ตกอยู่เหนือหรือใต้ mean 6 ค่าติดต่อกัน แม้ว่าค่าจะยังคงอยู่ภายใน $\pm 1SD$ หรือ $\pm 2SD$ อาจเกิดจากเปลี่ยนชุดตรวจ Lot ใหม่ที่แตกต่างจากเดิม มีการปรับแก้เครื่องมือ หรือเปลี่ยน calibrator เป็นต้น
- Trend หมายถึง ความผิดปกติมีลักษณะค่อยเป็นค่อยไป พบค่า QC ค่อยๆ ลดลงหรือเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 6 ค่า ติดต่อกัน ซึ่งอาจเกิดจากการเสื่อมของเครื่องมือหรือชุดตรวจ เป็นต้น

11.2.3.4 การติดตามความเปลี่ยนแปลงโดยคำนวณข้อมูลสะสม : ได้แก่

- ค่า Mean ของข้อมูลสะสมมีการเปลี่ยนแปลง อาจสูงขึ้นหรือต่ำกว่าเดิม ซึ่งกระทบต่อ Accuracy อาจเกิดจาก การปรับแฉงตงเครื่องมือ เปลี่ยน Lot ชุดตรวจ หรือ calibrator หรือ Kit control
- SD, CV ของข้อมูลสะสมเปลี่ยนแปลง อาจกว้างขึ้นหรือแคบลงกว่าเดิม บ่งชี้ว่าความแม่นยำของระบบวิเคราะห์เปลี่ยนไปจากเดิม อาจเกิดจาก เครื่องมือเสื่อม เปลี่ยนบุคลากรใหม่ เครื่องมือหรือชุดตรวจไม่เหมือนเดิม

11.2.4 เมื่อผลการทำ IQC มีการละเมิดกฎการควบคุมคุณภาพ (out of control) และผลการทดสอบ HIV มีแนวโน้มที่จะผิดพลาดทางคลินิกอย่างมีนัยสำคัญให้ผู้จัดการคุณภาพพิจารณาส่งต้ออกผลการตรวจตัวอย่างผู้ป่วย ผู้จัดการวิชาการภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิกและผู้เกี่ยวข้องร่วมกันดำเนินการแก้ไขและทวนสอบลักษณะประสิทธิภาพ ลงบันทึกรายละเอียดการปรับปรุงแก้ไขที่ทำไปเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล IQC ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-025)

หมายเหตุ : TIQCon is Web base peer group comparison tool(inter-laboratory) for Roche SWA customers using Roche manufactured controls.


A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโอไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV 1/2 3.0)

- สารควบคุมคุณภาพที่ใช้ ได้แก่ Quality Control Sera For Anti HIV-1 (RP2) ที่ใช้เฉพาะกับชุดทดสอบแต่ละชุดทดสอบเท่านั้น ซึ่งมี 4 ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ตัวอย่างที่ให้ผลบวกแรงที่สุด (R1) ไปจนถึงตัวอย่างที่ให้ผลลบ (R4)
- ทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพทั้ง 4 ระดับ เมื่อมีการเปลี่ยน lot และเมื่อเปิดกล่องใหม่
- ทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่ให้ผลลบและผลบวกอ่อน 1 ระดับ มีการทดสอบใน first case หรือเดือนละ 1 ครั้ง

A3 : ชุดตรวจ อเลีย ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2

- เพื่อให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง ได้รวมการควบคุมคุณภาพวิธีการทดสอบ (procedure control) ลงในบริเวณแถบทดสอบที่เขียนกำกับว่า “Control” เมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบ ถ้ามาปรากฏเส้นสีแดงในช่อง Control bar ผลการทดสอบครั้งนั้นไม่สามารถยอมรับได้ ตัวอย่างตรวจนั้นต้องทำการทดสอบซ้ำ

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 20 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

- สารควบคุมคุณภาพที่ใช้ ได้แก่ Quality Control Sera For Anti HIV-1 (RP1) ที่ใช้เฉพาะกับชุดทดสอบแต่ละชุดทดสอบเท่านั้น ซึ่งมี 4 ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ตัวอย่างที่ให้ผลบวกแรงที่สุด (R1) ไปจนถึงตัวอย่างที่ให้ผลลบ (R4)
- ทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพทั้ง 4 ระดับ เมื่อมีการเปลี่ยน lot และเมื่อเปิดกล่องใหม่
- ทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่ให้ผลลบและผลบวกอ่อน 1 ระดับ มีการทดสอบใน first case หรือเดือนละ 1 ครั้ง

12. ขั้นตอนการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparisons)

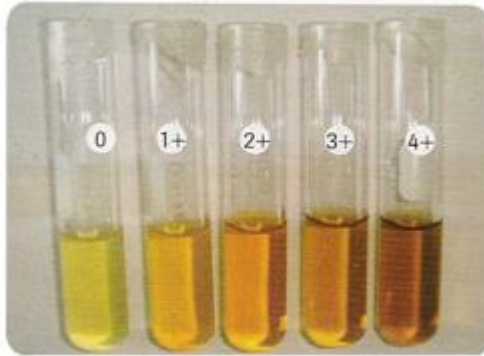
การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparisons) ให้ดำเนินการตามระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21) โดยมีข้อกำหนดและเกณฑ์คุณภาพที่สำคัญ ดังนี้

- 12.1 ให้ห้องปฏิบัติการสมัครเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการการตรวจเอชไอวีซีโรโลยีแห่งชาติ (HIV Serology) เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ HIV ระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งให้บริการโดย ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุตรธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ความถี่ในการประเมิน 3 รอบ/ปี จำนวนตัวอย่าง 8 ตัวอย่างต่อรอบ
- 12.2 ผู้ตรวจวิเคราะห์ที่รับผิดชอบงานตรวจวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิกในขณะนั้นดำเนินการตรวจวิเคราะห์หาค่า HIV โดยการตรวจพร้อมกันไปกับการตรวจตัวอย่างผู้ป่วยในงานประจำวันไม่เกินวันกำหนดส่งรายงานที่ระบุไว้ในแบบรายงานผล
- 12.3 บันทึกส่งรายงานผล online เข้าประเมิน(submit results) คู่มือหรือพิมพ์ผลการประเมินทาง rmsc8.dmsc.moph.go.th/PTUdon เมื่อโปรแกรมการทดสอบความชำนาญการตรวจ HIV ประเมินผลเสร็จแล้ว ให้ Download รายงานผลมาเก็บไว้ใช้ทบทวนประสิทธิภาพในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ
- 12.4 ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิกและเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องหารือกันเมื่อผลประเมินการทดสอบความชำนาญการตรวจ HIV ไม่เป็นไปตามเกณฑ์หรือเป้าหมายที่กำหนด วิเคราะห์สาเหตุที่แท้จริง ดำเนินการปฏิบัติการแก้ไขเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำ และบันทึกมาตรการแก้ไข/ป้องกันในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล EQA ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-020)

13. สิ่งรบกวน (interferences)

10.2. Serum/Plasma ที่มีส่วนประกอบต่อไปนี้ไม่รบกวนการทดสอบ HIV

| ลักษณะ ซีรัม/พลาสมา | ปริมาณของส่วนประกอบ | การเกรดปริมาณ |
|----------------------|--------------------------------------|---------------|
| Icterus | bilirubin < 60 mg/dL | 4+ |
| Hemolysis | hemoglobin < 500 mg/dL | 3+ |
| Lipemic (Intralipid) | Intralipid < 1500 mg/dL | 4+ |
| biotin | biotin (< 123 nmol/L or < 30 ng/mL). | |

ซีรัมเหลือง (Icteric serum)

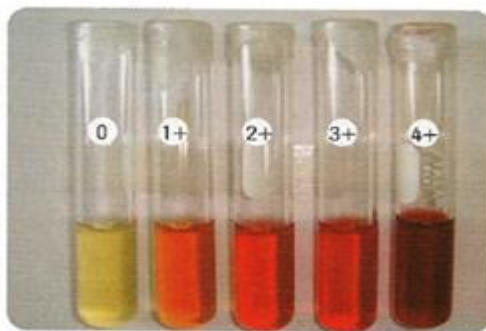
Bilirubin concentration

1+ = 2.5 mg/L = 0.25 mg/dL

2+ = 5.0 mg/L = 0.50 mg/dL

3+ = 10.0 mg/L = 1.00 mg/dL

4+ = 20.0 mg/L = 2.00 mg/dL

ซีรัมที่มีเม็ดเลือดแดงแตก (Hemolysed serum)

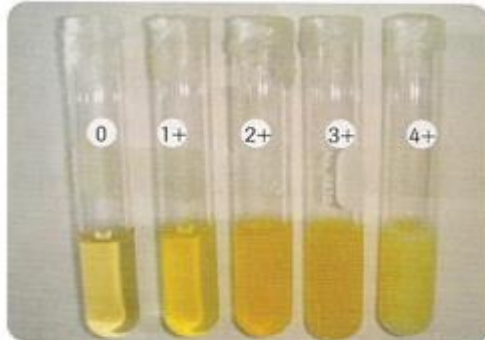
Hemoglobin concentration

1+ = 0.9 g/L = 90 mg/dL

2+ = 1.8 g/L = 180 mg/dL

3+ = 3.5 g/L = 350 mg/dL

4+ = 6.7 g/L = 670 mg/dL

ซีรัมขุ่นมีไขมัน (Turbid serum)

Absorbance 660 นาโนเมตร

1+ = 0.4

2+ = 0.8

3+ = 1.0

4+ = 1.2

หมายเหตุ

- คนไข้ที่ได้รับการรักษาโดยรับ biotin ในขนาดสูง (> 5 mg/day) จะสามารถเจาะเลือดตรวจได้หลังจากได้รับยาครั้งสุดท้าย ไม่น้อยกว่า 8 ชั่วโมง
- rheumatoid factor ไม่เกิน 1500 IU/mL ไม่รบกวนการทดสอบ
- ไม่เกิด false negative จาก high dose hook effect

14. หลักการของขั้นตอนการคำนวณเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ รวมทั้งที่เกี่ยวข้องกับความไม่แน่นอนของการวัด (principle of procedure for calculating results including, where relevant, the measurement uncertainty of measured quantity values)

a. การคำนวณให้ได้ผลวิเคราะห์

คอมพิวเตอร์ซอฟต์แวร์ในเครื่อง cobas e 601 จะคำนวณและกำหนดค่า cutoff ให้อัตโนมัติจากการตรวจวัดค่าของ Cal1 and Cal2 ในขั้นตอนการสอบเทียบ โดยผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
| | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 22 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

จะถูกรายงานผลเป็น reactive หรือ non-reactive อย่างใดอย่างหนึ่งตามผลการคำนวณค่า cutoff-index (COI; signal sample/cutoff)

b. การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัด -

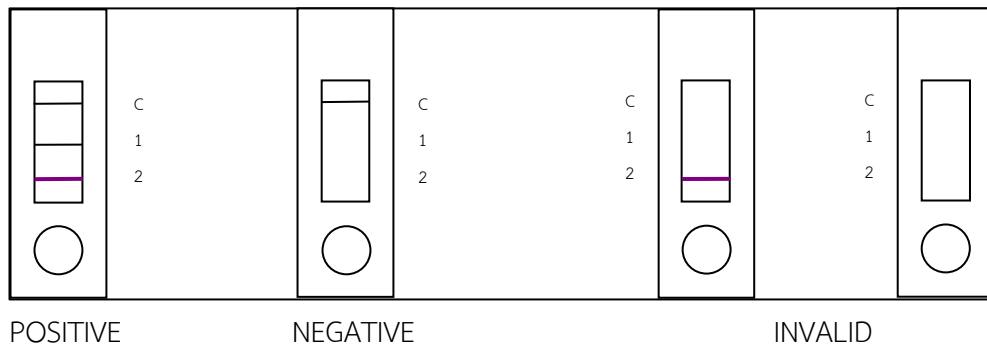
15. ช่วงอ้างอิงทางชีวภาพหรือค่าการตัดสินใจทางคลินิก (biological reference intervals or clinical decision values)

A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)

- Non reactive ซึ่งมีค่า Cutoff-index < 0.9
- Reactive ซึ่งมีค่า Cutoff-index ≥ 1.00
- Considered Borderline ซึ่งมีค่า Cutoff-index $\geq 0.9 - < 1.00$

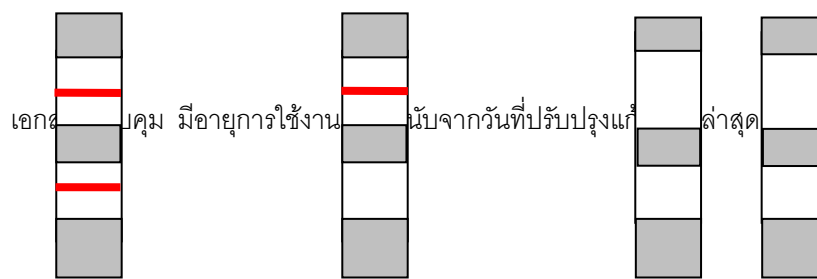
A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโออนไลน์ เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV 1/2 3.0)


- Positive (ผลบวก) :** ปรากฏแถบสี 2 แถบ บนแถบควบคุมและแถบทดสอบ 1 (“C” และ “1”) หรือปรากฏแถบสี 2 แถบ บนแถบควบคุมและแถบทดสอบ2 (“C” และ “2”) หรือปรากฏแถบสี 3 แถบ บนแถบควบคุม แถบทดสอบ 1 และแถบทดสอบ 2 (“C” “1” และ “2”)
- Negative (ผลลบ) :** ปรากฏแถบสีบนแถบควบคุม (“C”) เพียงแถบเดียว
- Invalid (แปลผลไม่ได้) :** ไม่ปรากฏแถบสีม่วงบนแถบควบคุม (“C”)



A3 : ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2

- Positive (ผลบวก) :** ปรากฏแถบสีแดง 2 แถบ ที่ตำแหน่ง Control และ Test
- Negative (ผลลบ) :** ปรากฏแถบสีแดง 1 แถบ ที่ตำแหน่ง Control
- Invalid (แปลผลไม่ได้) :** ไม่ปรากฏเส้นสีแดงที่ Control band หรือ ไม่ปรากฏเส้นสีแดงที่ Control band และ Test band



| | | | |
|--|---|-------------------------------------|--|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 23 จาก 31 หน้า | |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 | |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| Control band | Control band | Control band |
| Test band | Test band | Test band |
| POSITIVE | NEGATIVE | INVALID |

16. ช่วงที่รายงานผลการทดสอบได้ (reportable interval of examination results)

ค่า AMR (Analytical Measurement Range)

-

17. คำแนะนำสำหรับการพิจารณาผลเชิงปริมาณเมื่อผลไม่ได้อยู่ในช่วงการวัด (instructions for determining quantitative results when a result is not within the measurement interval)

-

18. ค่าวิกฤติ/ค่าแจ้งเตือนที่เหมาะสม (alert/critical values, where appropriate)

-

19. การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ (laboratory clinical interpretation)

A1 : HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2)

19.1 การแปลผลค่า Cutoff-index ของตัวอย่างตรวจ

Cutoff-index < 0.9 แปลผลเป็น non-reactive

Cutoff-index \geq 0.9 แต่ < 1.0 แปลผลเป็น considered borderline


Cutoff-index \geq 1.0 แปลผลเป็น reactive

19.1 เป็น reactive หรือ borderline ควรทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งโดยใช้น้ำยา Elecsys HIV Combi PT ถ้าได้ผล non-reactive ทั้งสองกรณี ให้รายงานผลเป็น negative สำหรับ HIV แต่ถ้ามีครั้งใดครั้งหนึ่งได้ผลเป็น reactive หรือ borderline ให้ทำการทดสอบเสริม (supplemental methods) เพิ่มเติม เช่น immunoblot หรือ การตรวจหา HIV RNA หากวิธีทดสอบเสริมยังให้ผลไม่ชัดเจน แนะนำให้ทำการตรวจติดตามต่อ

19.2 การแปลผลและรายงานผลการทดสอบ HIV ให้รายงานผลเป็น Non-reactive, Reactive

19.3 ในการทดสอบ HIV ห้องปฏิบัติการควรหลีกเลี่ยงการใช้คำว่า Positive กับผลที่เป็นการตรวจเบื้องต้นเพียงอย่างเดียว โดยยังไม่ได้ทำการทดสอบเสริมเพื่อช่วยยืนยันผลเพิ่มเติม

19.4 การรายงานผล HIV Reactive ใช้เฉพาะกับการตรวจพบปฏิกริยาของวิธีตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ตรวจเพียงชุดตรวจเดียว

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 24 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

A2 : ชุดทดสอบ เอสดี ไบโโอลิน เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0)

19.5 การแปลผลเบื้องต้นเฉพาะสำหรับชุดทดสอบ


- Positive (ผลบวก) แสดงว่าตัวอย่างนั้นให้ผลบวกคือมี antibody ต่อเชื้อ HIV 1 และ/หรือ 2
- Negative (ผลลบ) แสดงว่าตัวอย่างนั้นให้ผลลบคือไม่มี antibody ต่อเชื้อ HIV 1 และ/หรือ 2
- Invalid (แปลผลไม่ได้) ไม่สามารถแปลผลได้ ต้องทำการทดสอบซ้ำด้วยแถบหรือตลับทดสอบอันใหม่
- ผลลบที่ได้จากการทดสอบด้วยชุดตรวจเอสดี ไบโโอลิน เอช ไอวี – ½ 3.0 ไม่ได้หมายความว่าไม่ได้มีการติดเชื้อเอชไอวี -1 และเอชไอวี -2 โดยสิ้นเชิง ตัวอย่างตรวจอาจมีระดับแอนติบอดีต่อเอชไอวี-1 และเอชไอวี – 2 ที่ต่ำ
- ตัวอย่างตรวจที่ให้ผลบวกควรตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น
- การทดสอบแอนติบอดีเอชไอวีเพียงอย่างเดียวไม่สามารถวินิจฉัยโรคเอดส์ (AIDS) ได้

A3 : ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2

- Positive (ผลบวก) แสดงว่าตัวอย่างนั้นให้ผลบวกคือมี antibody ต่อเชื้อ HIV 1 และ/หรือ 2
- Negative (ผลลบ) แสดงว่าตัวอย่างนั้นให้ผลลบคือไม่มี antibody ต่อเชื้อ HIV 1 และ/หรือ 2
- Invalid (แปลผลไม่ได้) ไม่สามารถแปลผลได้ ต้องทำการทดสอบซ้ำ ด้วยแถบหรือตลับทดสอบอันใหม่
- ผลการทดสอบเป็นบวก ไม่ว่าจะเส้นสีแดงที่บริเวณช่องแสดงผลการตรวจของผู้ป่วยจะเข้มหรือจางกว่าเส้นสีแดงที่บริเวณช่องควบคุมผลการทดสอบ
- ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี – ½ ผลิตเพื่อใช้ตรวจแอนติบอดีต่อเอชไอวี - 1 และเอชไอวี – 2 ในซีรัม พลาสมา หรือเลือดครบส่วนของมนุษย์ การนำไปใช้ตรวจตัวอย่างที่เป็นของเหลวส่วนอื่นของร่างกาย หรือตัวอย่างหลายๆตัวอย่างที่นำมารวมกันอาจให้ผลไม่ถูกต้อง
- ความเข้มข้นของเส้นสีแดงที่เกิดขึ้นเมื่อได้ผลบวกนั้น ไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับความแรงแอนติบอดีในตัวอย่างตรวจ
- ผลลบจากการทดสอบด้วยชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี – ½ ไม่สามารถตัดความเป็นไปได้ที่อาจมีการติดเชื้อเอชไอวี ผลลบปลอมสามารถเกิดขึ้นได้ในกรณีต่อไปนี้ : มีแอนติบอดีในระดับที่ต่ำกว่าขีดจำกัดในการตรวจพบของชุดตรวจนี้ (เช่น การสร้างแอนติบอดีระยะแรก), มีการติดเชื้อจากไวรัสที่กลายพันธุ์จากเดิม ซึ่งชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี- ½ ไม่ครอบคลุมได้, แอนติบอดีต่อเชื้อ เอชไอวี ในคนไข้ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของชุดตรวจนี้, สภาวะหรือการเก็บรักษาตัวอย่างตรวจซึ่งไม่เหมาะสมที่ทำให้แอนติบอดีสูญเสียคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาสาเหตุต่างๆ ดังกล่าว ควรคำนึงถึงการแปลผลการทดสอบที่ให้ผลลบ ควรใช้ข้อมูลทางคลินิก (เช่น อาการหรือปัจจัยเสี่ยงของผู้ป่วย) เพื่อประกอบผลการทดสอบด้วย
- ตัวอย่างตรวจที่ให้ผลบวกควรตรวจซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีทดสอบอื่น และประมวลผลการตรวจร่วมกับข้อมูลและการตรวจทางคลินิกก่อนทำการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อหรือไม่
- เลือดครบส่วนหรือพลาสมาที่ใช้สารกันเลือดแข็งตัวอื่นที่ไม่ใช่ฮีปารินอาจทำให้เกิดผลที่ผิดพลาดได้

19.6 การแปลผลเพื่อสรุปรายงานผลทดสอบตามวัตถุประสงค์เพื่อการวินิจฉัย

ใน National guideline หรือ WHO guideline ระบุว่า การตรวจเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV ควรทำการทดสอบด้วยชุดตรวจ 3 วิธี โดยเลือกวิธีที่มีความไวสูง เป็นวิธีตรวจเบื้องต้นเพียงวิธีเดียว ตัวอย่างที่

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 25 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

ให้ผล Non reactive จากการตรวจเบื้องต้นวิธีเดียวนี้ สามารถรายงานผล Negative ได้ทันที ส่วนตัวอย่างที่ให้ผล Reactive ควรตรวจเสริม ด้วยวิธีที่มีความจำเพาะสูงอีก 2 วิธี เพื่อยืนยันว่าเป็นผลบวกจริง จึงกำหนดเป็นแนวทางปฏิบัติให้เหมาะสม ดังนี้

- 19.6.1 ให้ใช้ชุดทดสอบ HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2) เป็นการทดสอบเบื้องต้น (A1) ถ้าได้ผล Reactive ให้ตรวจเสริมด้วยชุดทดสอบ SD BIOLINE HIV-1/2 3.0 (A2) เป็นการทดสอบเสริมวิธีที่ 1 และ ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2 (A3) เป็นการทดสอบเสริมวิธีที่ 2 ตามลำดับ
- 19.6.2 อ้างอิงจากหนังสือแนวทางการตรวจรักษาและป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทย ปี 2557 กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ถ้าผลการตรวจจาก 3 วิธีไม่สอดคล้องกัน ห้ามรายงานผลเป็น Positive ให้รายงานผลเป็น Inconclusive แล้วนัดผู้ป่วยเจาะเลือดซ้ำเพื่อยืนยันผลในครั้งต่อไปอีก 2 สัปดาห์ และ/หรือ 1 เดือน และ 3 เดือนตามลำดับ (ดูตารางที่ 1)
- 19.6.3 ถ้าผลการตรวจทั้ง 3 วิธี ได้ผลเป็น Reactive เหมือนกันก่อนที่จะรายงานผล ต้องเจาะเลือดผู้ป่วยตรวจซ้ำอีก 1 ครั้งเพื่อเป็นการยืนยันตัวบุคคล เมื่อได้ผลตรงกันจึงสรุปรายงานผลเป็น Anti-HIV Positive

ตารางที่ 1 : กลวิธีการทดสอบ Anti-HIV เพื่อวัตถุประสงค์ด้าน Diagnosis อ้างอิงจากหนังสือแนวทางการตรวจรักษาและป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทย ปี 2557 กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

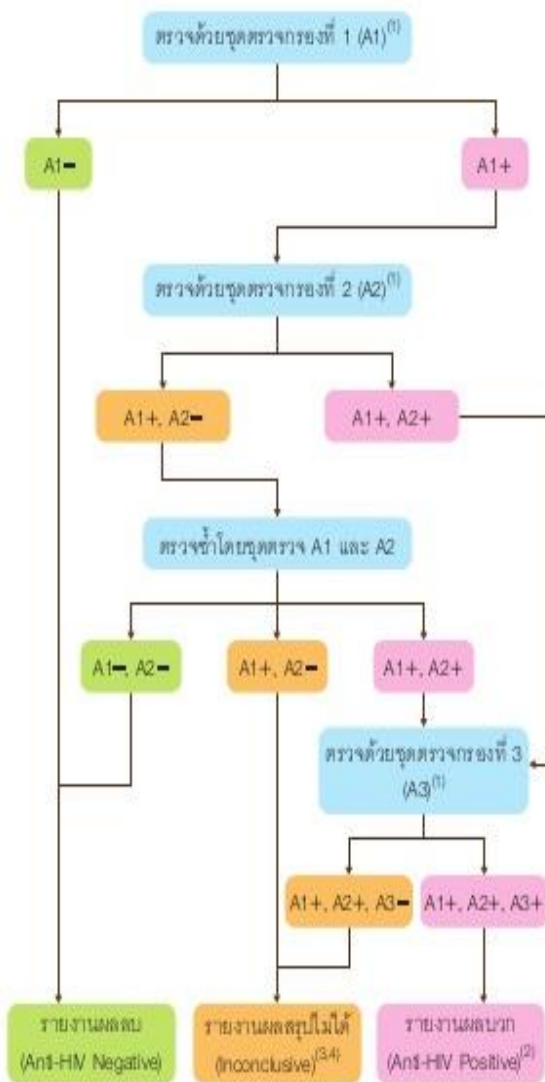


| รูปแบบ | การทดสอบเบื้องต้น (A1) | การทดสอบเสริมวิธีที่ 1 (A2) | การทดสอบเสริมวิธีที่ 2 (A3) | การสรุปและรายงานผล |
|--------|--|--------------------------------|---|---|
| | HIV combi PT (HIV-1 antigen and total antibodies to HIV-1 and HIV-2) | SD BIOLINE HIV-1/2 3.0 | ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอรั่ม เอชไอวี-1/2 | |
| 1 | Non-Reactive | ไม่ต้องทำ | ไม่ต้องทำ | Negative |
| 2 | Reactive | Reactive | Reactive | Positive |
| 3 | Reactive | Reactive | Non-Reactive | Inconclusive |
| 4 | Reactive | Non-Reactive | กรณีนี้ให้ตรวจซ้ำทั้งวิธีการทดสอบเบื้องต้นและการทดสอบเสริมวิธีที่ 1 ถ้าให้ผลเหมือนเดิมไม่ต้องตรวจด้วยการทดสอบเสริมวิธีที่ 2 | Inconclusive |
| 5 | Reactive | ไม่มีชุดการทดสอบเสริมวิธีที่ 1 | ไม่มีชุดการทดสอบเสริมวิธีที่ 2 | Reactive และควรส่งตรวจต่อด้วยวิธีที่มีหลักการแตกต่างกันที่ห้องปฏิบัติการอื่นต่อไป |

หมายเหตุ : การรายงานผลสรุปผลไม่ได้ (inconclusive) ให้ติดตามผู้มารับบริการตรวจซ้ำภายใน 2 สัปดาห์ และ/หรือ 1 เดือน และ 3 เดือนตามลำดับ โดยทดสอบใหม่ตามลำดับขั้นตอน A1, A2 และ A3 เช่นเดิม หากผลตรวจเป็นสรุปผลไม่ได้เหมือนเดิมภายใน 3 เดือน ให้รายงานผลลบ และปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ



แผนภูมิที่ 1 แนวทางการวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ใหญ่ และเด็กที่มีอายุ 18 เดือนขึ้นไป



24

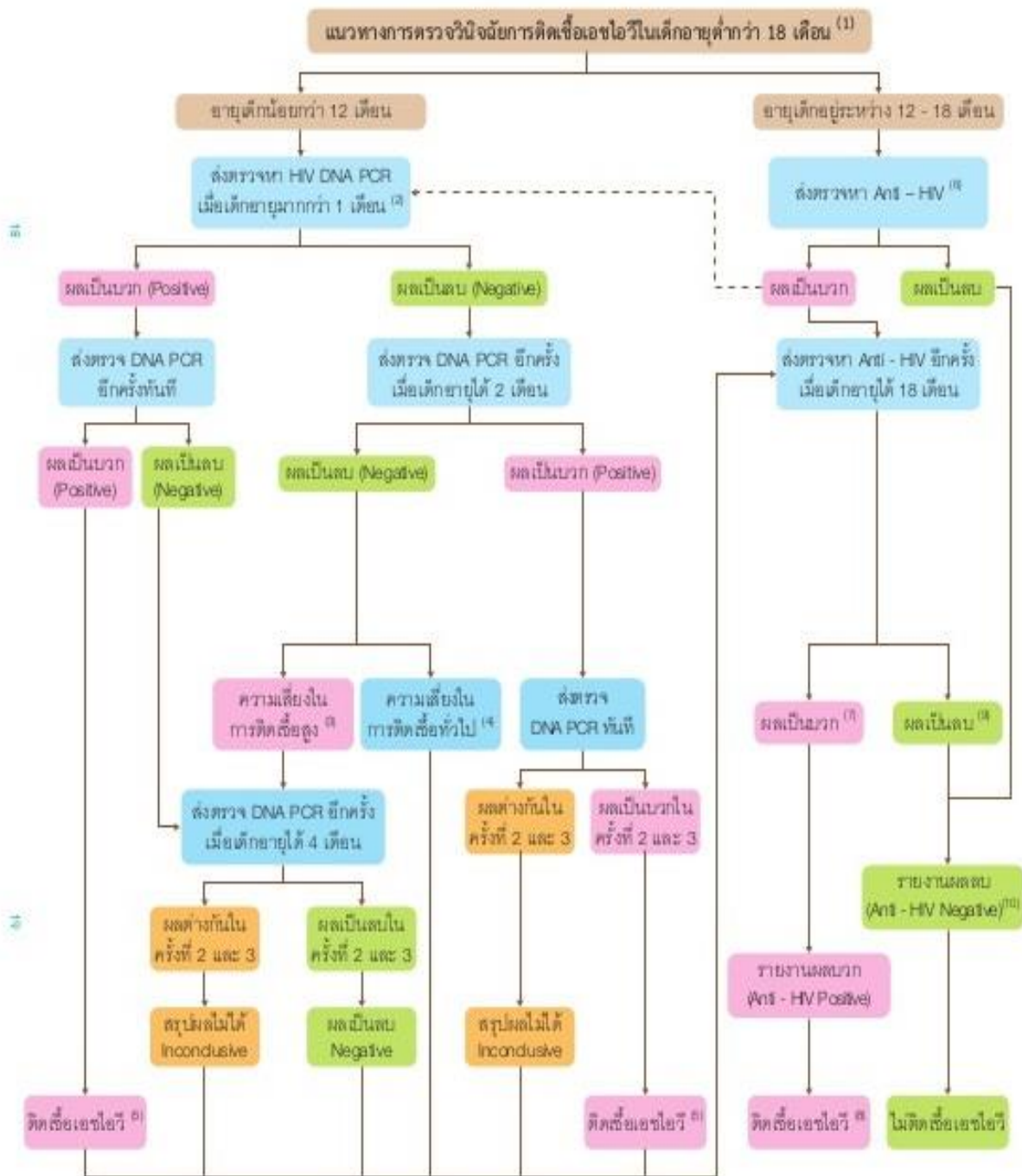
หมายเหตุ


- (1) A1, A2 และ A3 หมายถึง ชุดทดสอบตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ชนิดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับที่มีแอนติเจนต่างชนิดกัน โดยชุดทดสอบที่ 1 ต้องมีความไวมากกว่าชุดทดสอบที่ 2 และ 3
- (2) ในกรณีผล positive ให้รายงานผลตรวจให้กับผู้ที่เกี่ยวข้องแล้วตรวจสอบ หากพบว่าเป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่หรือตรวจเป็นครั้งแรก (newly diagnosed) ควรแนะนำให้เจาะเลือดตัวอย่างที่ 2 เพื่อยืนยันตัวบุคคล โดยใช้ชุดทดสอบเดิมอย่างน้อย 1 วิธี
- (3) การรายงานผลสรุปไม่ได้ (inconclusive) ให้ติดตามผู้มารับบริการตรวจซ้ำภายในหลัง 2 สัปดาห์ และ/หรือ 1 เดือน และ 3 เดือนตามลำดับ โดยทดสอบใหม่ตามลำดับขั้นตอน A1, A2 และ A3 เช่นเดิม หากผลการตรวจเป็น "สรุปผลไม่ได้" เหมือนเดิมภายใน 3 เดือนให้รายงานผลลบและปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ อย่างไรก็ตาม ผู้ให้คำปรึกษาควรเน้นเรื่องการป้องกันการแพร่เชื้อแก่ผู้อื่นอย่างเคร่งครัดด้วย
- (4) ในกรณีที่ชุดตรวจแรกที่เลือกใช้ เป็นชุดตรวจชนิดที่ตรวจได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในเวลาเดียวกัน และชุดตรวจที่ 2 และ/หรือ 3 เป็นชุดตรวจที่ตรวจได้เฉพาะแอนติบอดีอย่างเดียว แล้วผลการตรวจเป็น "สรุปผลไม่ได้" ให้ดำเนินการเจาะเลือดตรวจซ้ำในเวลาต่อมาตามข้อที่ (3) **หรือถ้าทำได้** ควรส่งตัวอย่างตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธีการอื่น ๆ เช่น NAT หรือ neutralization p24 assay หากประเมินได้ว่าผู้รับบริการอาจติดเชื้ออยู่ในระยะแฝง

25



แผนภูมิที่ 2 แนวทางการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการในเด็กที่อายุต่ำกว่า 18 เดือน



| | | |
|--|---|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 29 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

19.7 วิธีการรายงานผล

19.7.1 ให้บันทึกผลการวิเคราะห์ลงในแบบบันทึกการทดสอบเชิงคุณภาพและกึ่งปริมาณวิเคราะห์ สาขาอิมมูโนวิทยาคลินิก (FM-LAB-212) และบันทึกใน LIS ด้วยข้อความว่า Negative หรือ Positive ตามสรุปรายงานผลในขั้นตอนการแปลผล โดยผู้ตรวจวิเคราะห์รับผิดชอบเป็นผู้พิมพ์ใบรายงานผลออกจาก LIS

19.7.2 การส่งมอบรายงานผล Anti-HIV ซึ่งเป็น test ที่จำกัดสิทธิผู้เข้าถึงข้อมูลมากกว่า test ทั่วไป ให้ผู้ตรวจวิเคราะห์หรือหัวหน้างานทะเบียนพยาธิวิทยาเป็นผู้ส่งมอบใบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์แก่แพทย์ผู้ส่งตรวจหรือผู้ที่ถูกกำหนดสิทธิในการรับมอบผลการตรวจ HIV เท่านั้น ไม่ส่งมอบให้ญาติผู้ป่วยโดยเด็ดขาด โดยผลการตรวจทั้งกรณี Positive หรือ Negative จะบรรจุในซองกระดาษสีขาว หน้าซองระบุเพียง HN ของผู้ป่วย ปิดผนึกซองพร้อมกำกับด้วยลายเซ็นผู้ตรวจวิเคราะห์หรือผู้รับรองผล และต้องมีการเจาะเลือดซ้ำเพื่อยืนยันตัวบุคคลก่อนรายงานผล Anti-HIV Positive ในรายที่ยังไม่เคยมีการรายงานผลเป็น Positive มาก่อน

19.7.3 การส่งรายงานผลวิเคราะห์ในรูปแบบ computer file เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ไม่มีสิทธิเข้าถึงข้อมูลความลับของผลการทดสอบ HIV test ในตัวอย่างผู้ป่วย จะมองไม่เห็นชื่อ test และผลวิเคราะห์ของ test ดังกล่าวปรากฏใน LIS (LIS จะซ่อน test ที่เป็นความลับไว้ทันทีที่ห้องปฏิบัติการยืนยันรับใบคำขอตรวจและตรวจรับตัวอย่างเข้าสู่ LIS) รวมทั้งพิมพ์ผลจาก LIS ก็ไม่ได้เช่นกัน

19.7.4 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่สามารถเห็น test ที่ถูกส่งตรวจ เห็นผลวิเคราะห์และพิมพ์ผล test ที่เป็นความลับใน LIS ได้ได้แก่ ผู้มีหน้าที่ตรวจวิเคราะห์/ผู้จัดการวิชาการ/หัวหน้าห้องปฏิบัติการเท่านั้น หน่วยงานที่ส่งตรวจก็จะไม่รู้ผลใน HIS เช่นกัน เพราะผลจะถูกรายงานจาก LIS เข้าสู่ HIS ด้วยข้อความที่กำหนดไว้ เช่น “รายงานผลการทดสอบแล้วเมื่อ..ว.ด.ป...” ส่วนผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องตรงตามความเป็นจริงจะถูกเก็บไว้ใน LIS และจะถูกส่งมอบให้แก่แพทย์หรือผู้ที่ถูกกำหนดสิทธิรู้ข้อมูลความลับผู้ป่วยในหน่วยงานที่ส่งตรวจด้วยใบรายงานผลที่เป็นกระดาษบรรจุในซองกระดาษสีขาว เมื่อแพทย์เปิดอ่านผลแล้วให้ทำลายทิ้ง

20 แหล่งที่มาของค่าแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น (potential sources of variation)

20.1 น้ำยา (Reagent)

20.1.1 เสื่อมสภาพจากการเก็บรักษาไม่ถูกต้องหรือหมดอายุ

20.1.2 เปลี่ยน lot ใหม่, เปลี่ยน HIVCOMPT cassette อันใหม่

20.1.3 มีฟองอากาศ ปริมาตรไม่เพียงพอ

20.1.4 เก็บรักษา HIVCOMPT cassette โดยไม่ตั้งให้ตรงอาจทำให้เกิดฟองอากาศ

20.2 สารสอบเทียบ (Calibrator)

- เทคนิคการละลาย เช่น ละลายผิวดัดส่วน, เทคนิคในการเตรียมผิวดัด (การไปเปิด, ระยะเวลาในการละลายสั้นหรือยาวเกินไป ควรใช้ระยะเวลาในการละลายประมาณ 40 นาทีโดยใช้เทคนิคตามคำแนะนำของผู้ผลิต), การละลายสารสอบเทียบที่แช่แข็งให้ได้อุณหภูมิห้อง (freeze-thaw) ใช้เวลานานเกินไปหรือเร็วเกินไป, ตัวทำละลายสกปรก (ควรใช้ Purified Water Diluents หรือเอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด



reagent grade water), ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันเนื่องจากผสมให้เข้ากันไม่ดีตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมไปจนถึงการผสมให้เข้ากันไม่ดีก่อนการตรวจวัดค่าของ calibrator

- มีการระเหยเนื่องจากการบรรจุ calibrator ปริมาณน้อยใน sample cup ร่วมกับการตั้งทิ้งไว้นาน หรือนำ Calibrator ที่เหลือซึ่งผ่านการใช้แล้วมาใช้สอบเทียบซ้ำอีก
- เปลี่ยน lot ใหม่
- เสื่อมสภาพหรือหมดอายุ
- มีฟองอากาศ
- ใช้ Blank ไม่เหมาะสม

20.3 เครื่องมือ (Analyzer)

- แหล่งกำเนิดแสง (source lamp) เสื่อมตามอายุการใช้งาน
- ท่อนำส่งน้ำยาที่ต่อเชื่อมกับ reagent probe อุดตัน ตีบ ขาดความยืดหยุ่น
- Cuvette สกปรก
- probe สกปรก
- กระแสไฟฟ้าไม่คงที่
- เลยเวลา Calibration (การทำ Re-calibration ไม่ควรเกิน 28 วัน สำหรับน้ำยา HIVCOMPT Lot เดิมและ ไม่เกิน 7 วัน สำหรับน้ำยาที่ใช้งานอยู่กล่องเดิม)
- Measurement syringe รั่ว/เสื่อม
- หลังการทำ preventive maintenance ครั้งใหญ่ หรือเปลี่ยนอะไหล่ใหม่ เช่น source Lamp, reagent probe, sample probe แล้วไม่ได้ calibration ใหม่
- ทำ maintenance check หรือทำ preventive maintenance เลยวงรอบหรือไม่ทำตามเงื่อนไข คำแนะนำที่ผู้ผลิตเครื่องมือกำหนด


20.4 ตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ (Sample)

- ตัวอย่างมีการ clot ในระหว่างการตรวจวิเคราะห์ในเครื่องวิเคราะห์
- ตัวอย่างมีการระเหยเนื่องจากตั้งทิ้งไว้นานเกินไปก่อนถูก sample probe ดูดไปตรวจวิเคราะห์ โดยเฉพาะกรณีที่มีการแบ่งตัวอย่างปริมาณน้อยใส่ Hitachi cup/Hitachi micro cup

21 เอกสารอ้างอิง (references)

- 21.1 แนวทางการตรวจวินิจฉัย รักษา และป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทย ปี 2563/ 2564 (RF-LAB-062)
- 21.2 คู่มือการตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวี สำหรับเทคนิคการแพทย์ ผู้จัดทำสภาเทคนิคการแพทย์ (RF-LAB-064)
- 21.3 ใบแทรกน้ำยา HIVCOMPT (PI-LAB-067)
- 21.4 ใบแทรกน้ำยา ชุดทดสอบ เอสดี ไบโโอลิน เอชไอวี – 1/2 3.0 (SD BIOLINE HIV ½ 3.0)
- 21.5 ใบแทรกน้ำยา ชุดตรวจ อเลียว ดีเทอร์มิน เอชไอวี-1/2
- 21.6 คู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator's manual cobas 6000 analyzer series (MN-LAB-065)
- 21.7 ระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การจัดการกระบวนการทดสอบ (WP-LAB-20)
- 21.8 ระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21)

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
|  | แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา | |
| | วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ HIV | |
| | รหัสเอกสาร : WI-LAB-067 | หน้า 31 จาก 31 หน้า |
| | แก้ไขครั้งที่ : 3 | วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566 |

22 ภาคผนวก -



ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร.....WI-LAB-067 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ HIV

| วัน/เดือน/ ปี | ฉบับแก้ไข ครั้งที่ | รายละเอียด | ลงชื่อ |
|---------------|-----------------------|--|----------------|
| 11 พ.ย.62 | 0 | ฉบับแรก | นายศาสตรศิลป์ |
| 1 พ.ย. 63 | 1 | แก้ไขทั้งฉบับ | ร.ต.ศาสตรศิลป์ |
| 1 ก.ย. 64 | 2 | <p>แก้ไขทั้งฉบับ</p> <p>- แก้ไข ข้อ 6 เรื่อง ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง ซ้อย่อยที่ 6.1 ชุดตรวจ อเลียว ดี เทอร์มิน เอชไอวี-1/2 โดย ระบุให้สามารถใช้ตัวอย่าง Serum จากหลอดบรรจุเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (Serum tube : จุกแดง) ได้</p> <p>- แก้ไข ข้อ 11 เรื่อง ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ โดยยกเลิกซ้อย่อยที่ 11.1.3.4 : ควรทำการควบคุมคุณภาพอย่างน้อยทุก ๆ 24 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้น้ำยา และได้เพิ่มซ้อย่อยที่ 11.1.4 : ตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพอย่างน้อยวันละ 1 ครั้ง ครบทุกระดับก่อนหรือทำพร้อมกันไปกับการตรวจตัวอย่างของผู้ป่วยรายแรกของวันนั้นเฉพาะในวันที่มีการตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบนี้</p> <p>- เพิ่มเติมเนื้อหา ข้อ 21 เรื่อง เอกสารอ้างอิง (references) ประกอบด้วย</p> <p>1. แนวทางการตรวจวินิจฉัย รักษา และป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทย ปี 2563/ 2564 (RF-LAB-062)</p> <p>2. คู่มือการตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวี สำหรับเทคนิคการแพทย์ ผู้จัดทำสภาเทคนิคการแพทย์ (RF-LAB-064)</p> | ร.ต.ศาสตรศิลป์ |
| 1 ก.พ. 66 | 3 | แก้ไข ข้อ 6 ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่งซึ่งใช้บรรจุตัวอย่างเริ่มต้นที่ส่งตรวจหา HIV ชุดของชุดตรวจ อเลียว ดี เทอร์มิน เอชไอวี-1/2 | ร.ต.ศาสตรศิลป์ |

