

## 1. ความมุ่งหมาย (Purpose)

เพื่อใช้เป็นข้อกำหนดเพิ่มเติมด้านวิชาการตามมาตรฐาน ISO 15189 สาขาอณูชีววิทยาด้านโรคติดเชื้อ โดยจัดทำขึ้นภายใต้การกำกับของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยกำหนดวิธีการและเกณฑ์การตรวจประเมินในประเด็นที่ไม่ได้ระบุรายละเอียดไว้ในข้อกำหนดด้านวิชาการของมาตรฐาน ISO 15189

## 2. การใช้งาน (Application)

2.1 เพื่อใช้เป็นแนวทางปฏิบัติสำหรับผู้ตรวจประเมินด้านวิชาการในสาขาอณูชีววิทยาด้านโรคติดเชื้อของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เพื่อสร้างความเข้าใจที่ตรงกัน และให้การตรวจประเมินเป็นไปตามแนวทางและมาตรฐานเดียวกัน

2.2 เพื่อให้ห้องปฏิบัติการซึ่งอยู่ในขอบข่ายการประเมินตามมาตรฐาน ISO 15189 นำแนวทางในข้อกำหนดฉบับนี้ไปใช้ในการพัฒนาและธำรงรักษาระบบบริหารคุณภาพให้สอดคล้องกับข้อกำหนด

2.3 ขอบข่ายการรับรองภายใต้ข้อกำหนดนี้ เฉพาะการทดสอบทางอณูชีววิทยาสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรค (Pathogen Detection) ได้แก่ เชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และปรสิตในบริบทของโรคติดเชื้อเท่านั้น

## 3. เอกสารอ้างอิง (References)

3.1 College of American Pathologists. *Molecular pathology checklist*. Northfield (IL): College of American Pathologists; 2023. Report No.: MOL. Available from: <https://www.cap.org>

3.2 กระทรวงสาธารณสุข. *คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ทางห้องปฏิบัติการ SARS-CoV-2*. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข; 2564.

3.3 สุนนมาลย์ อุทัยมกุล. การเตรียมห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุลในการตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่: ประสบการณ์จากการระบาดใหญ่ของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่สถาบันบำราศนราดูร. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 2566;65(4):325-38.

#### 4. นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

**4.1 ระบบ Manual** คือ กระบวนการทดสอบทางอณูชีววิทยาที่ถูกดำเนินการโดยใช้กระบวนการที่ผู้ปฏิบัติงานดำเนินการด้วยตนเองในทุกขั้นตอนของการวิเคราะห์ โดยไม่ใช่เครื่องอัตโนมัติ

**4.2 ระบบ Semi-automated** คือ กระบวนการทดสอบทางอณูชีววิทยาที่ถูกดำเนินการโดยใช้เครื่องมือหรือระบบอัตโนมัติในบางขั้นตอนของกระบวนการวิเคราะห์

**4.3 ระบบ Fully automated** คือ กระบวนการทดสอบทางอณูชีววิทยาที่ถูกดำเนินการโดยระบบอัตโนมัติเต็มรูปแบบ ครอบคลุมตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมตัวอย่างจนถึงการออกรายงานผลวิเคราะห์

**4.4 Analytical sensitivity** คือ ความสามารถของวิธีทดสอบทางอณูชีววิทยาในการตรวจจับสารพันธุกรรมเป้าหมายเช่น DNA หรือ RNA ได้แม้มีปริมาณในระดับต่ำมาก

**4.5 Analytical specificity** คือ ความสามารถของวิธีทดสอบทางอณูชีววิทยาในการระบุและตรวจจับสารพันธุกรรมเป้าหมาย เช่น DNA หรือ RNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยไม่เกิดผลบวกปลอม (False positive) อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้าม (Cross contamination) กับสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอื่น หรือสิ่งรบกวนที่ไม่เกี่ยวข้อง

**4.6 Accuracy** คือ ความสามารถของวิธีทดสอบทางอณูชีววิทยาในการให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกับค่าจริงที่เป็นที่ยอมรับ (ค่ามาตรฐานอ้างอิง) ของสารพันธุกรรมที่ทำการตรวจวิเคราะห์ เช่น DNA หรือ RNA โดยผลการทดสอบนั้นควรมีความเบี่ยงเบนจากค่ามาตรฐานน้อยที่สุดภายใต้เงื่อนไขของกระบวนการวิเคราะห์ที่กำหนด

**4.7 Precision** คือ ความสามารถของวิธีทดสอบทางอณูชีววิทยาในการให้ผลการทดสอบที่คงที่หรือใกล้เคียงกันเมื่อทำการทดสอบซ้ำด้วยตัวอย่างเดียวกัน ทั้งภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน (Repeatability) และภายใต้เงื่อนไขที่แตกต่างกัน (Reproducibility)

**4.8 Reportable range** คือ ช่วงของปริมาณสารพันธุกรรม เช่น DNA หรือ RNA หรือค่าที่ได้จากการทดสอบ ซึ่งห้องปฏิบัติการสามารถรายงานผลได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ โดยไม่จำเป็นต้องปรับปริมาตรหรือเจือจางตัวอย่างก่อนทำการทดสอบ

**4.9 Internal control (IC)** คือ ลำดับกรดนิวคลีอิกที่ถูกใส่เข้าไปในระบบการตรวจวิเคราะห์พร้อมกับตัวอย่างการทดสอบ เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องและประสิทธิภาพของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอน โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ Endogenous Internal Control คือ ลำดับกรดนิวคลีอิกที่พบได้ตามธรรมชาติในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ เช่น ยีน "housekeeping" และ Exogenous Internal Control คือ ลำดับกรดนิวคลีอิกที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและเติมเข้าไปในตัวอย่างในปริมาณที่ทราบค่า สามารถออกแบบให้มี primer binding site ที่แตกต่างจากเป้าหมายหลักเพื่อหลีกเลี่ยงการแข่งขันในการจับกับ primer ได้

**4.10 ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (Quality control samples)** คือ ตัวอย่างควบคุมที่ไม่ใช่ตัวอย่างของสิ่งที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ซึ่งนำมาใช้เพื่อประเมินความถูกต้อง ความแม่นยำ หรือประสิทธิภาพของกระบวนการวิเคราะห์ทั้งหมดหรือบางส่วนในระบบการทดสอบทางอณูชีววิทยา โดยประกอบด้วย:

4.10.1 Positive control (PC) คือ ตัวอย่างควบคุมที่มีสารพันธุกรรมเป้าหมายอยู่ในปริมาณที่ทราบแน่ชัด ใช้เพื่อยืนยันว่าระบบการตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจจับเป้าหมายได้อย่างถูกต้อง และมีประสิทธิภาพตามที่กำหนดไว้

4.10.2 Negative control (NC) คือ ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีสารพันธุกรรมเป้าหมาย ใช้เพื่อตรวจสอบว่าไม่มีการเกิดผลบวกปลอม (False positive) ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของสารพันธุกรรม หรือการเกิดปฏิกิริยาข้าม (Non-specific amplification)

4.10.3 Non - template control (NTC) คือ ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีสารพันธุกรรมใด ๆ อยู่เลย โดยทั่วไปใช้การเติมน้ำปราศจากสารพันธุกรรม (Nuclease-free water) แทนสารตัวอย่างเพื่อยืนยันว่าน้ำยาอุปกรณ์ และขั้นตอนการทดสอบไม่มีการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมเป้าหมาย

**4.11 Cross contamination** คือ การที่สารพันธุกรรมเช่น DNA หรือ RNA จากตัวอย่างหนึ่งปนเปื้อนไปยังตัวอย่างอื่นในกระบวนการวิเคราะห์ ส่งผลให้เกิดผลตรวจผิดพลาด เช่น ผลบวกปลอม (False positive)

**4.12 Carry over contamination** คือ การที่ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ตกค้างและปนเปื้อนไปยังการทดสอบ ส่งผลให้เกิดผลบวกปลอม (False positive)

**4.13 Limit of Detection (LOD)** คือ ปริมาณต่ำที่สุดของสารพันธุกรรมเป้าหมายเช่น DNA หรือ RNA ที่สามารถตรวจพบได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือ ภายใต้เงื่อนไขการทดสอบที่กำหนด ยกตัวอย่างเช่น หาก LOD = 5 copies/mL หมายความว่า สารพันธุกรรมที่ 5 copies/mL เป็นระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้

## 5. เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated document)

5.1 N 07 15 003 นโยบายและหลักเกณฑ์การทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการและการประเมินความสามารถการทดสอบ

## 6. วิธีดำเนินการ (Procedures)

### 6.1 นโยบายและหลักเกณฑ์

#### 6.1.1 ข้อกำหนดทั่วไปสำหรับการตรวจประเมิน

6.1.1.1 ทบทวนชนิดตัวอย่าง รายการทดสอบ และหลักการวิเคราะห์ที่ขอการรับรองถูกต้อง เป็นไปตามหลักวิชาการ และมีผลการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญที่สอดคล้องตามข้อกำหนดเพิ่มเติม N 07 15 003

6.1.1.2 ชนิดตัวอย่างในขอบข่ายที่ขอการรับรองชัดเจน สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการปฏิบัติงานจริง ต้องตรงตามขอบข่ายที่ได้ยื่นขอการรับรอง ให้ผู้ตรวจประเมินทบทวนขอบข่ายกับห้องปฏิบัติการ ก่อนการตรวจประเมินในการประชุมเปิด

6.1.1.3 ชื่อการทดสอบให้ใช้ชื่อตามมาตรฐานสากล หรือตามประกาศสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติตามภาคผนวก

### 6.2 บุคลากร

บุคลากรมีคุณสมบัติและความสามารถตามที่มาตรฐาน ISO 15189 กำหนด ต้องได้รับการฝึกอบรม หรือมีประสบการณ์ตรงในรายการทดสอบ เพื่อให้มั่นใจว่าบุคลากรมีความรู้และความสามารถเพียงพอในการดำเนินการทดสอบด้านอณูชีววิทยาทางด้านโรคติดเชื้อ อย่างถูกต้องและเชื่อถือได้

### 6.3 การควบคุมกระบวนการ

#### 6.3.1 ขั้นตอนก่อนวิเคราะห์ (Pre - analytical)

6.3.1.1 ระบุชนิดของสิ่งส่งตรวจในขอบข่ายที่ขอการรับรองชัดเจน ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการปฏิบัติงานจริงต้องตรงตามขอบข่ายที่ได้ยื่นขอการรับรอง

6.3.1.2 การเก็บรักษาและการขนส่ง มีการกำหนดระยะเวลาในการดำเนินการตรวจวิเคราะห์ที่ชัดเจน เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการทดสอบ มีสถานที่เก็บตัวอย่างเพื่อรอการตรวจที่เหมาะสม สภาวะและอุณหภูมิถูกต้องตามหลักวิชาการที่กำหนด และมีระบบป้องกันการเข้าถึงโดยผู้ที่ไม่ได้รับอนุญาต

6.3.1.3 การสกัดสารพันธุกรรม มีการควบคุมคุณภาพ โดยแนะนำให้เพิ่ม Internal Control (IC) ร่วมในกระบวนการสกัด เพื่อยืนยันประสิทธิภาพการสกัดสารพันธุกรรม

#### 6.3.2 ขั้นตอนวิเคราะห์ (Analytical)

##### 6.3.2.1 Method Validation

สำหรับชุดทดสอบที่พัฒนาโดยห้องปฏิบัติการ (Laboratory-developed tests; LDTs หรือ In-house Testing) และชุดทดสอบที่ได้รับการรับรองจากหน่วยงานกำกับดูแล (เช่น FDA

approved, CE-marked) แต่มีการปรับเปลี่ยนหรือดัดแปลงโดยห้องปฏิบัติการ จะต้องกำหนดและประเมิน Analytical performance โดยใช้ตัวอย่างจริงทางคลินิกหรือวัสดุควบคุมที่เหมาะสม ทั้งนี้หากเป็นไปได้ควรตรวจวิเคราะห์อย่างน้อย 20 ตัวอย่างโดยประกอบด้วยตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบรวมกัน สำหรับการตรวจประเมินในหัวข้อต่างๆ ดังนี้

6.3.2.1.1 Qualitative test ประเมิน Accuracy, Precision, Analytical sensitivity และ Analytical specificity

6.3.2.1.2 Quantitative test ประเมิน Accuracy, Precision, Analytical sensitivity, Analytical specificity และ Reportable range

หมายเหตุ: การทดสอบด้าน Molecular Typing เช่น Next Generation Sequencing (NGS), Sanger Sequencing ควรมีการประเมิน accuracy, precision และ LOD ด้วย Clinical sample โดยตรวจวิเคราะห์อย่างน้อย 5 - 20 ตัวอย่าง โดยต้องมีสัดส่วนใกล้เคียงกัน กรณีใช้จำนวนตัวอย่างน้อยกว่า 20 รายการ ต้องมีการชี้แจงเหตุผลว่ามีข้อจำกัดอย่างไรที่ทำให้ไม่สามารถดำเนินการตามจำนวนที่แนะนำได้

#### 6.3.2.2 Method Verification

มีระเบียบวิธีปฏิบัติการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ก่อนนำมาใช้งานตามคุณลักษณะเฉพาะที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ และมีความเหมาะสมกับขอบเขตการใช้งานของห้องปฏิบัติการและการตัดสินใจทางคลินิก โดยให้ใช้ตัวอย่างอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง กรณีตัวอย่างมีข้อจำกัดการเข้าถึงตัวอย่าง เช่น เป็นเชื้อพบได้ยาก สามารถใช้ตัวอย่างผลบวกที่แท้จริง (True positive) และตัวอย่างผลลบที่แท้จริง (True negative) รวมกัน ในช่วงอย่างน้อย 5 - 20 ตัวอย่างโดยต้องมีสัดส่วนใกล้เคียงกัน กรณีใช้จำนวนตัวอย่างน้อยกว่า 20 รายการ ต้องมีการชี้แจงเหตุผลว่ามีข้อจำกัดอย่างไรที่ทำให้ไม่สามารถดำเนินการตามจำนวนที่แนะนำได้ในเอกสารผลการประเมิน การทวนสอบวิธีวิเคราะห์โดยประเมินคุณลักษณะสำคัญในหัวข้อดังต่อไปนี้

##### 6.3.2.2.1 Accuracy

##### 6.3.2.2.2 Precision

6.3.2.2.3 Reportable range (กรณีเป็นการทดสอบ Quantitative ตัวอย่างที่ใช้ต้องครอบคลุมค่าที่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงค่าต่ำ ค่ากลาง และค่าสูง รวมทั้งแสดง mean และ bias) ต้องมีวิธีทวนสอบว่าวิธีวิเคราะห์เหมาะสมก่อนนำมาใช้ โดยมั่นใจว่าการทดสอบที่เลือกมาใช้มีประสิทธิภาพสอดคล้องตามที่คุณผู้ผลิตกล่าวอ้าง

6.3.2.3 การควบคุมคุณภาพ ทุกรอบของการตรวจวิเคราะห์ ต้องมีตัวอย่างควบคุมคุณภาพ ได้แก่ Positive Control, Negative control หรือ Non - template control

### 6.3.3 ขั้นตอนหลังวิเคราะห์ (Post - analytical)

6.3.3.1 ข้อมูลจากการวิเคราะห์ การรายงานผล และการใช้งานระบบเทคโนโลยีสารสนเทศ ต้องมีวิธีปฏิบัติในการดูแลจัดเก็บและรักษาข้อมูลให้มีความปลอดภัย รวมทั้งคุ้มครองข้อมูลส่วนบุคคลตามกฎหมายที่เกี่ยวข้อง

6.3.3.2 การจัดการวัสดุติดเชื้อหลังการตรวจวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของ ISO 15189, ISO 15190 และพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2558 รวมถึงกฎหมายที่เกี่ยวข้อง

## 6.4 การจัดการพื้นที่ห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการจัดให้มีพื้นที่แยกออกเป็น 3 ส่วนอย่างชัดเจนคือ พื้นที่เตรียมน้ำยา (Reagent preparation room) พื้นที่เตรียมตัวอย่างและสกัดสารพันธุกรรม (Sample preparation/extraction room) ห้องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและวิเคราะห์ผล (Amplification / detection room) โดยจัดผังการไหลของงานให้เป็นทิศทางเดียว (Unidirectional Workflow) จากการเตรียมน้ำยา → เตรียมตัวอย่าง → เพิ่มปริมาณ/วิเคราะห์ผล โดยไม่มีการย้อนกลับ แต่ละห้องปฏิบัติการต้องมีการประเมินความเสี่ยง เพื่อป้องกัน Cross contamination หรือ Carry over contamination โดยแบ่งตามระบบปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

### 6.4.1 ระบบ Manual

6.4.1.1 Reagent preparation room เป็นพื้นที่สำหรับจัดเก็บ เตรียม และผสมน้ำยา สำหรับปฏิกิริยา PCR (Master mix) ทั้งนี้ห้ามนำตัวอย่างผู้ป่วย สารพันธุกรรมที่สกัดแล้ว หรือ PCR product กลับเข้าสู่พื้นที่นี้โดยเด็ดขาด

6.4.1.2 Sample preparation/extraction room เป็นพื้นที่สำหรับการเปิดหรือแบ่ง สิ่งส่งตรวจ และการสกัดสารพันธุกรรมโดยต้องดำเนินการภายในตู้ BSC Class II นอกจากนี้ยังเป็นพื้นที่สำหรับการเติมสารพันธุกรรมลงในหลอด Master mix ที่ได้รับจาก Reagent preparation room

6.4.1.3 Amplification / detection room เป็นพื้นที่สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เช่น PCR หรือ Real-time PCR และการวิเคราะห์ PCR product เช่น Gel electrophoresis หรือ Fluorescence detection โดยห้ามนำอุปกรณ์หรือหลอด PCR จากห้องนี้ย้อนกลับไปยังพื้นที่อื่นโดยเด็ดขาด

6.4.1.4 กรณีไม่สามารถแยกพื้นที่ออกเป็น 3 ส่วนได้ ให้แบ่งพื้นที่ออกเป็น 2 บริเวณ ได้แก่

6.4.1.4.1 บริเวณเตรียมน้ำยาและเตรียมตัวอย่าง/สกัดสารพันธุกรรม ซึ่งต้องมีมาตรการควบคุมความเสี่ยง โดยกิจกรรมการทำงานทั้งสองขั้นตอนนี้ต้องไม่ทำพร้อมกัน พร้อมมาตรการ เช่น การใช้ PPE และอุปกรณ์เฉพาะบริเวณ ทำความสะอาดด้วยสารทำลาย DNA/RNA มีการประเมินความเสี่ยงเพื่อตรวจสอบควบคุมการปนเปื้อนเป็นระยะ ภายในห้องนี้ต้องประกอบด้วยตู้ PCR cabinet ที่มีหลอด UV สำหรับดำเนินการตามข้อ 6.4.1.1 และตู้ BSC Class II สำหรับดำเนินการตามข้อ 6.4.1.2

6.4.1.4.2 บริเวณเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์สารพันธุกรรม ให้ดำเนินการตามข้อ

6.4.1.3

6.4.2 ระบบ Semi - automated

6.4.2.1 ห้องปฏิบัติการต้องแยกพื้นที่ reagent preparation และ sample preparation ตามข้อ 6.4.1.1 และ 6.4.1.2 หรือใช้การแบ่งบริเวณร่วมกับมาตรการควบคุมความเสี่ยงหากไม่สามารถแยกเป็นห้องจริงได้ เครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติต้องติดตั้งภายใน sample preparation room และต้องมีมาตรการป้องกันการปนเปื้อนที่เหมาะสม

6.4.1.2 พื้นที่ Amplification room ให้ดำเนินการตามข้อ 6.4.1.3

6.4.3 ระบบ Fully automated

ห้องปฏิบัติการดำเนินการกระบวนการสกัดและตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ อย่างไรก็ตามให้แยกพื้นที่ Sample preparation จากส่วนอื่นก่อนนำตัวอย่างเข้าเครื่องอัตโนมัติ หากสิ่งส่งตรวจมีความเสี่ยงสูงให้ดำเนินการเตรียมตัวอย่างภายในตู้ BSC Class II

6.4.4 ห้องปฏิบัติการมีแสงสว่างเพียงพอ มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของห้องปฏิบัติการให้เหมาะสมต่อการปฏิบัติงานในแต่ละขั้นตอนสอดคล้องตามที่ระบุไว้ในวิธีปฏิบัติงานและคุณลักษณะของเครื่องมือ

6.4.5 การทำความสะอาดห้องปฏิบัติการ ต้องแยกอุปกรณ์ทำความสะอาดสำหรับแต่ละพื้นที่ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน โดยใช้มือบด้นฝุ่นหรือผ้าทำความสะอาด ห้ามใช้ไม้กวาด

6.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

ห้องปฏิบัติการต้องจัดให้มีเครื่องมือและอุปกรณ์ประจำพื้นที่โดยติดป้ายบนเครื่องมือและอุปกรณ์ เพื่อแสดงพื้นที่ใช้งานอย่างชัดเจน โดยห้ามนำเครื่องมือและอุปกรณ์ข้ามพื้นที่ใช้งานเด็ดขาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อน วัสดุสิ้นเปลืองที่ใช้ในกระบวนการต้องเป็นชนิดที่เหมาะสมกับงานทางอณูชีววิทยา

เช่น Filter Tips / Pipette Tips / PCR Tubes ต้องเป็นชนิด RNase/DNase - free และถุงมือยางแบบ ไร้แป้ง

6.6 น้ำต้องเป็นชนิด Molecular grade หรือเทียบเท่า มีคุณสมบัติ RNase/ DNase-free โดยต้องแยก จัดเก็บอย่างชัดเจนตามขั้นตอนการปฏิบัติงาน และน้ำยาที่ใช้ควรมีการแบ่งน้ำยาเป็นส่วนย่อย (working aliquot) ให้พอดีกับการใช้งานแต่ละครั้ง เพื่อหลีกเลี่ยงการ Freeze – thaw ซ้ำหลายครั้ง ซึ่งอาจทำให้น้ำยาเสื่อม คุณภาพ

## 6.7 ขั้นตอนการทดสอบ

### 6.7.1 Pre - analytical step

6.7.1.1 การรับตัวอย่าง ทวนสอบชนิดตัวอย่างของสิ่งส่งตรวจถูกต้องและมีปริมาณที่เหมาะสมต่อการทดสอบ

6.7.1.2 การเก็บและขนส่งตัวอย่างบรรจุในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม ป้องกันการเสื่อมสภาพของตัวอย่าง และมีการขนส่งสิ่งส่งตรวจภายใต้อุณหภูมิที่กำหนด

6.7.1.3 การเตรียมตัวอย่าง มีการควบคุมคุณภาพในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม เช่น การเติม Internal control (IC) เพื่อให้มั่นใจได้ว่าขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมมีประสิทธิภาพ

### 6.7.2 Analytical step

6.7.2.1 การเตรียม Master mix ต้องดำเนินการในพื้นที่สะอาดที่แยกจากพื้นที่อื่น ตามข้อ 6.4 และดำเนินการเตรียมน้ำยาตาม Protocol ที่กำหนด

6.7.2.2 ทูรอปในการตรวจวิเคราะห์ ต้องมีการควบคุมคุณภาพการตรวจโดยเติม Positive control, Negative control หรือ Non-template control

6.7.2.3 ขั้นตอนการตั้งค่าโปรแกรมการตรวจวิเคราะห์บนเครื่องมือ Thermal cycler หรือ Real-time PCR เป็นไปตาม Protocol ที่กำหนด

### 6.7.3 Post - analytical step

6.7.3.1 การวิเคราะห์และแปลผล มีการตรวจสอบผล Control และพิจารณาค่า Ct value หรือลักษณะของ curve รวมไปถึงพิจารณาผลบวก ผลลบ ผลกำกวมตามเกณฑ์ที่กำหนด

6.7.3.2 การเก็บตัวอย่าง PCR product ควรเก็บที่ -20 ถึง -80°C ตามระยะเวลาที่ห้องปฏิบัติการกำหนด

6.7.4 การควบคุมและลดการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ ต้องมีมาตรการป้องกันการปนเปื้อนอย่างเป็นระบบในแต่ละพื้นที่ปฏิบัติงาน นอกจากโครงสร้างทางกายภาพและวิธีปฏิบัติงานตามข้อ 6.4 6.5 และ 6.6

แล้ว หลังจากปฏิบัติงานต้องทำความสะอาดพื้นที่และอุปกรณ์ด้วยแอลกอฮอล์ 70% หรือสารทำความสะอาด เช่น 0.5% sodium hypochlorite หรือสารทำลายสารพันธุกรรม เช่น DNA/RNA away และเช็ดตามด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง

6.7.5 แนะนำห้องปฏิบัติการควรมีการติดตามและตรวจสอบการปนเปื้อนภายในห้องปฏิบัติการ โดยมีการตรวจติดตามการปนเปื้อน เช่น Wipe test, Equipment blank หรือ Room QC จากพื้นผิวหรือสภาพบรรยากาศของห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจปนเปื้อนหรือตกค้างของสารพันธุกรรมในพื้นที่ โดยมีความถี่ในการตรวจสอบเป็นไปตามแนวทางที่กำหนด เช่น อย่างน้อยทุก 6 เดือน

#### 6.8 การประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

6.8.1 ห้องปฏิบัติการต้องมีการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ ตามข้อ 6.3.2.3

6.8.2 มีผลการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญที่สอดคล้องตามข้อกำหนดเพิ่มเติม N 07 15 003

#### 6.9 วิธีดำเนินการภายหลังการตรวจวิเคราะห์

6.9.1 การเก็บรักษาข้อมูล เช่น raw data หรือข้อมูลพันธุกรรม ต้องอยู่ในสภาพที่ตรวจสอบได้ ไม่น้อยกว่า 5 ปีนับจากวันที่ทดสอบตัวอย่าง โดยบันทึกและรายงานผลที่เก็บต้องมีมาตรการป้องกันการสูญหายหรือสูญเสียข้อมูลรวมทั้งป้องกันการเข้าถึงข้อมูลโดยไม่ได้รับอนุญาต

### 7. การบันทึกข้อมูลและเอกสารที่ใช้ (Data record and Used document)

-

### 8. รายละเอียดอื่นๆ (Supplementary notes)

#### ภาคผนวก

#### ตัวอย่างการระบุขอบข่ายการรับรอง

| ชนิดตัวอย่าง | รายการทดสอบ   | วิธีทดสอบ                        |
|--------------|---|----------------------------------|
| EDTA Blood   | Hepatitis B virus HBV PCR - viral load                          | Real-time PCR: COBAS 6800 system |
| EDTA Blood   | Hepatitis C virus HCV viral load - Quantitative (Real time PCR) | Real time PCR: COBAS 6800 system |

### 9. ประวัติการแก้ไขเอกสาร (History of Change)

| แก้ไขครั้งที่ | การเปลี่ยนแปลงเอกสาร | ผู้จัดทำ/ผู้แก้ไข    | วันที่ออกเอกสาร |
|---------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| 00            | เอกสารใหม่           | นางสาวสลิสา สารพัฒน์ |                 |