

แผนทดสอบความชำนาญ การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยวิธี Real-time RT-PCR

1. คำนำ

การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) คือ การประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการโดยการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ที่เข้าร่วมในแผนทดสอบ หน่วยงานทดสอบความชำนาญ (PT Provider) จะดำเนินการจัดส่งตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวไปยังห้องปฏิบัติการสมาชิกในเวลาใกล้เคียงกัน เพื่อให้สมาชิกตรวจวิเคราะห์และส่งผลกลับภายในระยะเวลาที่กำหนด ซึ่งการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญนี้ เป็นกระบวนการควบคุมคุณภาพภายนอกของการตรวจวิเคราะห์ (external quality control) ซึ่งเป็นหนึ่งในดัชนีชี้วัดระดับความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ดำเนินการจัดการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการด้านการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยวิธี Real-time RT-PCR เพื่อให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกมีการพัฒนาความสามารถและคุณภาพในการตรวจวิเคราะห์ ทำให้หน่วยงานเกิดความเชื่อมั่นในการรายงานผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ และมีคุณภาพตามมาตรฐานสากล

2. นิยาม

- 2.1 หน่วยงานทดสอบความชำนาญ (PT Provider) คือ หน่วยงานที่รับผิดชอบและดำเนินกิจกรรมทุกอย่างเกี่ยวกับแผนทดสอบความชำนาญ
- 2.2 ห้องปฏิบัติการสมาชิก (PT participants) คือ ห้องปฏิบัติการที่มีการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยวิธี Real-time RT-PCR ซึ่งแสดงความจำนงเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ
- 2.3 ตัวอย่างทดสอบ (PT Sample) คือ ตัวอย่างที่หน่วยงานทดสอบความชำนาญส่งให้แก่ห้องปฏิบัติการสมาชิกเพื่อทำการวิเคราะห์ โดยตัวอย่างทดสอบต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงตัว
- 2.4 ผู้ประสานแผนทดสอบความชำนาญ (Scheme coordinator) คือ บุคคล หรือกลุ่มบุคคลที่รับผิดชอบประสานทุกกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินแผนทดสอบความชำนาญ
- 2.5 ค่ากำหนด (Assign value) คือ ค่าที่นำมาใช้ในการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการสมาชิกโดยการคำนวณผลทางสถิติ

3. หน่วยงานทดสอบความชำนาญ (PT Provider)

กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
50/2 เขตกลาง ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10900

4. ผู้ประสานแผนทดสอบความชำนาญ (Coordinator)

นางสาวกุลธัญรัตน์ ภาชนะ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
นางสาวหนึ่งฤทัย แดงฟู นักวิทยาศาสตร์

5. วัตถุประสงค์

- 5.1 เพื่อประเมินความสามารถในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยวิธี Real-time RT-PCR ของห้องปฏิบัติการสมาชิก
- 5.2 เพื่อเปรียบเทียบและพัฒนาคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสมาชิกให้ได้ตามมาตรฐาน
- 5.3 เพื่อยืนยันความสามารถของวิธีทดสอบในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยวิธี Real-time RT-PCR

6. หลักเกณฑ์และวิธีการคัดเลือกห้องปฏิบัติการสมาชิก

ห้องปฏิบัติการสมาชิกต้องเป็นห้องปฏิบัติการที่ตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยวิธี Real-time RT-PCR โดยกรอกแบบตอบรับแสดงความจำนงเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ ดังข้อที่ 8

7. กำหนดการทดสอบความชำนาญ

ดำเนินการทดสอบปีละ 1 รอบ โดยคาดว่าจะมีสมาชิกไม่น้อยกว่า 10 แห่งต่อรอบ
จัดทำแผนการทดสอบความชำนาญ : สิงหาคม-ตุลาคม ของทุกปี
ส่งหนังสือเชิญสมัครและรับสมัคร : ตุลาคม-พฤศจิกายน ของทุกปี
ส่งตัวอย่างทดสอบให้แก่สมาชิก : ธันวาคม ของทุกปี
วันเริ่มทดสอบ: มกราคม ของทุกปี
วันปิดรับรายงานผลทดสอบ: กุมภาพันธ์ ของทุกปี
ส่งรายงานผลฉบับสมบูรณ์: เมษายน ของทุกปี

8. การสมัครเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ

ห้องปฏิบัติการสมาชิกสมัครเข้าร่วมแผนการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการด้านการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยวิธี Real-time RT-PCR โดยสมัครผ่านลิงก์ <https://forms.gle/6HTHzRzAHHuUBabg9> หรือทาง QR-code



9. การจ้างเหมาช่วงการทดสอบ

ทุกขั้นตอนไม่มีการจ้างผู้รับเหมาช่วง

10. ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

ตัวอย่างเป็นแอนติเจน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บรรจุในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยทุกตัวอย่างผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) จำนวน 10 ตัวอย่าง/ชนิด และความคงตัว (stability) จำนวน 2 ตัวอย่าง/ชนิด/สภาวะ ค่า assign value ได้จากการเตรียมตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญและทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน แต่เนื่องจากเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพจึงไม่มีค่า uncertainty และ ไม่สามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา

11. การบริหารจัดการตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

11.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

ทำการ Inactivate เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล และบรรจุในหลอดฝาเกลียว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พันพาราฟินฟิล์มรอบฝา ติดฉลาก ระบุเลขที่ตัวอย่าง เลขชุดตัวอย่าง ขอบข่าย และ รอบปีที่ทดสอบ โดยจัดตัวอย่างเป็นชุดในถุงพลาสติกซิปล็อก รายละเอียดตามเอกสารวิธีปฏิบัติงาน การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล ในตัวอย่างสัตว์ปีก โดยวิธี Real-time RT-PCR (W-VIR-206)

11.2 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

สุ่มตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง/Strain/Dilution มาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติ หากค่า %CV น้อยกว่า 5 ถือว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน กรณีที่ %CV ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ ให้ใช้หลักสถิติอื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ หากยังไม่ผ่านเกณฑ์ ให้เตรียมตัวอย่างใหม่

11.3 การทดสอบความคงตัว

11.3.1 นำตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง/Strain/Dilution มาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยสถิติที่เหมาะสม หากไม่ผ่านเกณฑ์ ให้เตรียมตัวอย่างใหม่ โดยระยะเวลาหรือสภาวะการทดสอบ ดังนี้

11.3.1.1 ขณะเก็บตัวอย่างก่อนส่งให้แก่ห้องปฏิบัติการ ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4-8 °C

11.3.1.2 ณ สภาวะเดียวกันกับการขนส่ง คือ จัดเก็บในกล่องโฟมที่มี ice pack อุณหภูมิ 4-8 °C เป็นระยะเวลา 3 วัน

11.3.1.3 ทดสอบในวันทำการถัดไปหลังจากวันสุดท้ายของการปิดรับรายงานผลการทดสอบ

11.4 การหาค่า Assign value

ค่า Assign value หาได้จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน เนื่องจากค่าที่ทดสอบได้ควรใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เตรียมไว้ก่อนจัดส่ง ซึ่งมีการทดสอบทั้งหมด 10 ซ้ำ ได้ค่า CV < 5% หรืออาจใช้สถิติอื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

11.5 การบรรจุและการติดฉลากตัวอย่างทดสอบ

บรรจุตัวอย่างในหลอดฝาเกลียว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พันพาราฟินฟิล์มรอบฝา ติดฉลาก ระบุเลขที่ตัวอย่าง เลขชุดตัวอย่าง ขอบข่าย และรอบปีที่ทดสอบ โดยจัดตัวอย่างเป็นชุดในถุงพลาสติกซิปล็อก

11.6 การส่งตัวอย่างทดสอบ

จัดส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกทางไปรษณีย์แบบลงทะเบียนด่วนพิเศษหรือบริษัทเอกชน โดยบรรจุ ice pack ในกล่องโฟม พร้อมคำแนะนำการดำเนินการทดสอบ

11.7 สภาพการเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบ

เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4-8 °C

12. การตอบรับตัวอย่างทดสอบ

เมื่อห้องปฏิบัติการสมาชิกได้รับตัวอย่างทดสอบให้กรอกแบบตอบรับตัวอย่างทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง หลังได้รับตัวอย่าง โดยส่งกลับมาทาง e-mail: pt.virusnih@gmail.com

13. การดำเนินการทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบได้ผ่านการ Inactivation แล้ว ห้องปฏิบัติการสมาชิกสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบได้ทันที

14. การรายงานผลการทดสอบ

14.1 ห้องปฏิบัติการสมาชิกรายงานผลเชิงคุณภาพเป็นผลบวก หรือผลลบ และรายงานผลเชิงปริมาณ โดยใช้ค่า cycle threshold (ct) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A สายพันธุ์ย่อย H5, H7, H9 และนิวคาสเซิล โดยแปลผลตามค่า cut-off ของแต่ละชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบตั้งเกณฑ์ไว้

14.2 รายงานผลการทดสอบในไฟล์ excel ที่หน่วยทดสอบความชำนาญจัดส่งให้ทาง e-mail ภายในระยะเวลาที่กำหนด โดยส่งผลการทดสอบทาง e-mail : pt.virusnih@gmail.com

15. การประเมินผลสมาชิก

ประเมินผลการทดสอบจากรายงานผลเชิงคุณภาพ คือ ผลบวก หรือ ผลลบ ที่ได้รับจากสมาชิกโดยเปรียบเทียบกับค่า assigned value ที่ได้จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน และคำนวณเป็นร้อยละ หากไม่ได้ 100% ถือว่าไม่ผ่าน สำหรับค่า Ct จะนำมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความไวของแต่ละชุดน้ำยาในกรณีที่ใช้ชุดน้ำยาแตกต่างกัน และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มน้ำยาเดียวกัน ด้วยสถิติที่เหมาะสม หากค่า p-value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

หากพบค่า outlier หรือมีค่าที่ถูกต้องจากการวิเคราะห์ทางสถิติ ให้ปฏิบัติตามข้อกำหนด ISO/IEC 13528: 2015 ข้อ 6.6 Outlier techniques for individual results

กรณีตัวอย่างไม่คงตัวหลังจากส่งตัวอย่างไปแล้ว ให้ประเมินผลสมาชิกแบบอิงกลุ่ม

16. รายงานการทดสอบความชำนาญ

รายงานผลการทดสอบความชำนาญการฉบับสมบูรณ์จัดส่งในรูปแบบ PDF file ทาง E-mail ในส่วนของรายงานจะแสดงเฉพาะรหัสของห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบของสมาชิก ค่ากำหนด และการประเมิน โดยแสดงในรูปแบบตารางตามความเหมาะสม

17. การรักษาความลับ และจริยธรรมของสมาชิก

ค่า assigned value จะไม่ถูกเปิดเผยแก่สมาชิกจนกว่าการประเมินจะแล้วเสร็จ และห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจะมีรหัสเฉพาะ และในส่วนของห้องปฏิบัติการสมาชิกนั้นควรมีความรับผิดชอบในการรายงานผลด้วยความซื่อสัตย์ ไม่ควรเปิดเผยผลวิเคราะห์ของตนเองหรือสอบถามคำตอบจากสมาชิกอื่น

18. การติดต่อสื่อสารกับห้องปฏิบัติการสมาชิก

กรณีที่มีปัญหาหรือมีข้อสงสัยเกี่ยวกับแผนการทดสอบ ห้องปฏิบัติการสมาชิกสามารถติดต่อสื่อสารกับหน่วยงานทดสอบความชำนาญผ่านผู้ประสานงาน ดังนี้

นางสาวกุลธัญรัตน์ ภาคะ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ

นางสาวหนึ่งฤทัย แดงฟู นักวิทยาศาสตร์

กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

50/2 เขตจตุจักร อ.ปทุมธานี แขวงลาดยาว เขตจตุจักร จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10900

โทรศัพท์ 02 5798 0913 E-mail: pt.virusniah@gmail.com

กรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในกิจกรรมทดสอบความชำนาญ จะมีการแจ้งผู้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญทันที

ผู้จัดทำ.....

(น.ส.กุลธัญรัตน์ ภาคะ)

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ

20/ต.ค./2565

ผู้ทบทวน.....

(น.ส.ณัฐกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์)

นายสัตวแพทย์ชำนาญการ

20/ต.ค./2565

ผู้ทบทวน.....

(น.ส.ชญานิ์ เจนพานิชย์)

ผู้จัดการด้านคุณภาพ

25/ต.ค./2565

ผู้อนุมัติ.....

(นายบัณฑิต นวลศรีฉาย)

ผู้บริหารด้านวิชาการ

28/ต.ค./2565