



คณะแพทยศาสตร์
เพื่อเพื่อนมนุษย์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
FACULTY OF MEDICINE PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

Selecting & Validating Test kits: Practical Perspectives from Laboratory Experts

รุ่งเรือง อารุมโนกุล

22 กรกฎาคม 2568

เนื้อหาที่อยากเล่า

วัตถุประสงค์การคัดเลือกใช้งาน

Method Verification/Method Validation

Work Instruction/ IFU

Clinical sample

วิธีมาตรฐาน/วิธีอ้างอิง: วิธีทำ/ ตัวอย่างที่ใช้/ Collection time

คุณลักษณะของชุดตรวจ:

Sensitivity, Specificity, Stability, LoD/cutoff
value, LoQ,

Quality & Reliability



Quality Management

Try to manage all aspects of the organization in order to excel in all dimensions that are important to "customers"

Two aspects of quality:

features: more features that meet customer needs = higher quality

freedom from trouble: fewer defects = higher quality

Quality

Perform the intended function

Minimize variation

Customer focus

Reliability

Quality over time

Probability of mission success

Failure-free

+ Process owner gain

ทำไมเราควรทำ MV ก่อนใช้ชุดตรวจ

Method verification การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจ

- เพื่อยืนยันคุณลักษณะที่สำคัญของชุดตรวจนั้น
- เพื่อให้มั่นใจความถูกต้อง ความน่าเชื่อถือของผลการตรวจด้วยชุดตรวจนั้น
- เพื่อให้รู้ข้อจำกัดของชุดตรวจนั้น
- เพื่อสร้างความมั่นใจ ทักษะการใช้ชุดตรวจ และ องค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบนั้น

ปัญหาที่พบบ่อย

- จะคัดเลือกอย่างไร เลือกชุดไหนดี
- จะทำ **Method Verification** อย่างไร ให้ผล **MV**ของเพื่อนได้มัย
- จะใช้เกณฑ์อะไร ประเมิน **MV**ให้**Specialist** ทำแทนดีมัย
- จำเป็นต้องทำ **MV** ทุกปีมัย : **Post marketing**

การคัดเลือกชุดตรวจ: จะเอาไปใช้งานอะไร

- เพื่อตรวจคัดกรองเบื้องต้น
- เพื่อตรวจยืนยัน
- เพื่อตรวจเฝ้าระวัง
- Anti HIV
- Avian Influenza : RT-PCR
- Influenza 2009:
 - realtime PCR
 - Influenza Antigen by ICT
- SAR CoV2
 - Realtime PCR, POCTPCR
 - ATK: Influenza Antigen,
 - Combo Antigen
 - SAR CoV2 Ab

Method Validation/Method Verification-1

Clinical Evaluation

- บริบทโรงพยาบาล กลุ่มเป้าหมายที่ใช้งาน
- Reference method/Standard protocol
- เกณฑ์การประเมิน ชุดตรวจ
- Sample design panel
- Results
- ข้อจำกัดการทดสอบของชุดตรวจ

ชุดตรวจที่คัดเลือก

- Work Instruction/IFU
- Principle
- Sample ที่ใช้
- Antigen/conjugate Ab
- validate result
- Reference data: แหล่งผลิต ผลประเมิน
จำนวนห้องแล็บที่ใช้งาน ผล EQA/PT

Method Validation/Method Verification-2

Anti HIV rapid test Evaluation

- WHO:HIV ASSAYS report 17, 18



การนำเสนอผลงานทางวิชาการ ภาคโปสเตอร์ (Poster Presentation)

งานประชุมทางวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วันที่ 7 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560

ประเมินประสิทธิภาพของการตรวจ Anti HIV ด้วยชุดตรวจแบบรวดเร็ว

รุ่งเรือง จารุมโนกุล พรนภัส สุระสมบัติพัฒนา อรนาถ สุดเดียวไกร ปิยะพงษ์ เกิดผล กุศล ณ สงขลา และสุวิติ ชูกำเนิด
หน่วยภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทนำ

ปัจจุบันการตรวจ Anti HIV ด้วยชุดตรวจแบบรวดเร็วนั้นเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายทั้งในรพ.ชุมชน และห้องปฏิบัติการฉุกเฉินเพราะสะดวก รวดเร็ว สามารถทราบผลอย่างรวดเร็ว มีขั้นตอนการทำที่ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน ซึ่งชุดตรวจที่จัดจำหน่ายเหล่านั้นมีความหลากหลายทั้งชนิดแอนติเจนและแหล่งผลิต จึงจำเป็นต้องประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจให้สอดคล้องกับบริบทการใช้งานของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์อย่างคุ้มค่าและมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกชุดตรวจ Anti HIV ที่มีคุณภาพเหมาะสมกับการนำมาใช้งานกรณีเร่งด่วนของภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์สงขลานครินทร์ โดยต้องมีความไว 100% และความจำเพาะ 98% ขึ้นไป

วัสดุและวิธีการ

- เตรียมตัวอย่างจำนวน 100 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ 1.กลุ่ม Anti HIV ที่ผลตรวจด้วยวิธี CMIA เป็นลบ จำนวน 49 ตัวอย่าง 2. กลุ่ม Anti HIV ที่ผลตรวจด้วยวิธี CMIA, ECLIA และ GPA เป็นบวก จำนวน 46 ตัวอย่าง 3. กลุ่ม Early HIV Infection ซึ่งผลตรวจด้วยวิธี CMIA, ECLIA เป็นบวกแต่ GPA เป็นลบ จำนวน 5 ตัวอย่าง
- นำตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ทดสอบกับชุดตรวจทั้ง 5 ชุด คือ 1. Alere Determine™ (Determine), 2. SD Bioline HIV-1/2 3.0 (SD), 3. Diagnostic kit for HIV(1+2) Ab (colloidal Gold) (DKH), 4. First response HIV 1-2.0 card test (First) และ 5. Wondfo® Diagnostic kit for HIV (1/2) Ab (Colloidal Gold) (Wondfo)
- นำผลการทดสอบทั้ง 5 ชุดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้เป็นหลัก

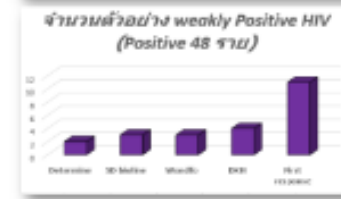
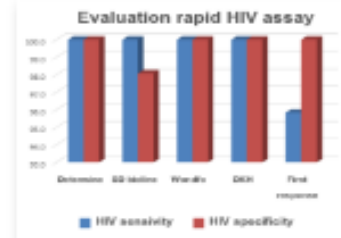
เอกสารอ้างอิง

WHO REPORT 18: LABORATORY PERFORMANCE AND OTHER OPERATIONAL CHARACTERISTICS

RAPID DIAGNOSTIC TESTS (COMBINED DETECTION OF HIV-1/2 ANTIBODIES AND DISCRIMINATORY DETECTION OF HIV-1 AND HIV-2 ANTIBODIES;

ผลการทดสอบ

	HIV		
	Negative (49)	Positive (46)	Early (5)
Determine	49	46	2
SD Bioline	48	46	2
Wondfo	49	46	2
DKH	49	46	2
First	49	45	2



วิจารณ์ผลการศึกษา

ชุดตรวจ Determine, DKH และ Wondfo มีความไวและความจำเพาะ 100% ชุดตรวจ SD มีความไว 100% และความจำเพาะ 98% สรุปชุดตรวจทั้ง 4 ชุดข้างต้น เหมาะสมกับบริบทการใช้งานของรพ.สงขลานครินทร์ ส่วนชุดตรวจ First มีความไว 95.8% และความจำเพาะ 100% ผลตรวจกลุ่ม HIV ที่ให้ผลบวกด้วยชุดตรวจ Determine, SD, Wondfo, DKH และ First นั้นพบ ผลบวกอ่อน (weakly positive) 2, 3, 3, 4 และ 11 ตัวอย่างตามลำดับ เมื่อใช้ทดสอบกับตัวอย่างกลุ่ม Early infection ทั้ง 5 ชุดตรวจให้ผลบวกตรงกัน 2 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง พบว่าความไวของชุดตรวจแบบรวดเร็วเหล่านี้ต่ำกว่าชุดตรวจที่เป็น 4th generation assay ฉะนั้นควรนำข้อจำกัดการทดสอบทั้งสองประเด็นมาพิจารณาคัดเลือกชุดตรวจให้เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน

สรุปผลการศึกษา

การประเมินคุณภาพชุดตรวจก่อนใช้งานเป็นสิ่งควรทำเพื่อให้ได้ชุดตรวจที่มีคุณภาพ และได้รับผลตรวจที่ถูกต้อง ผลการประเมินชุดตรวจสามารถนำไปประกอบการพิจารณาเลือกชุดตรวจให้ตรงวัตถุประสงค์การใช้งานของหน่วยงานอื่นๆ ได้

Collection sample time

- โอกาสที่จะตรวจพบ ขึ้นกับ
 - ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง
 - ปริมาณตัวเชื้อในขณะนั้น
 - ชนิดตัวอย่างที่เก็บ

- SAR CoV2

- น้ำลายตรวจพบช้ากว่า NPS/NS ประมาณ
ครึ่งวัน- 1 วัน

- น้ำลายให้ผลลบ เร็วกว่า NPS/NS

ไม่แนะนำให้ตรวจ Influenza, RSV ในน้ำลาย

- การแปลผล พึงระมัดระวังปัจจัยนี้ด้วย

วิธีอ้างอิง/ตัวอย่างอ้างอิง

- Influenza ยังไม่กำหนดวิธีมาตรฐานอ้างอิง
- ปัจจุบันที่มีกำหนดวิธีมาตรฐานคือ SAR CoV2, Anti HIV
- วัสดุอ้างอิง มี PT sample: SAR CoV2, Influenza, HPVDNA, Monkey POX
- การประเมินชุดตรวจ ขึ้นกับแต่ละห้องแล็บพิจารณา ออกแบบกำหนดเกณฑ์ประเมินเอง

Quality Sample

- **Collection** เก็บโดยผู้ชำนาญ จะได้ตัวอย่างที่มีคุณภาพมากกว่า
- ชนิดของ **swab** มีผลต่อปริมาณเชื้อที่เก็บได้
- **Transport media (VTM)** มีผลต่อประสิทธิภาพการทดสอบที่ใช้
- Stability Influenza A,B, RSV Antigen in VTM at 4C
- Matrix of sample: น้ำลาย, VTM, Direct swab

- Influenza 2009
- การนำ **rapid Antigen test by ICT** เป็นการทดสอบเสริม คัดกรองเบื้องต้น
- ห้ามใช้ **Inactivate VTM** ตรวจ ATK by ICT
- Dry swab Influenza Antigen for QC
- Clinical sample VS tissue culture media

เกณฑ์การประเมินชุดตรวจ

ชื่อโครงการ ประเมินชุดน้ำยาที่ใช้เทคนิคการตรวจแบบ rapid NAAT สำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสทางเดินหายใจ Influenza RSV และ SARS-CoV2 ในชุดตรวจเดียว

สถานะ	ชื่อ-สกุล	ตำแหน่ง	หน่วยงาน	สัดส่วนความ รับผิดชอบ (%)
หัวหน้าโครงการ	เกตุลดา เพ็งเกิด	นักเทคนิคการแพทย์	ภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา	50
ผู้ร่วมโครงการ	อนุสร วังกตศิลา	นักเทคนิคการแพทย์	ภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา	25
	ศศิภา จิตวรรณ	นักเทคนิคการแพทย์	ภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา	25

ตัวชี้วัดและ
วิธีการวัดผล

1. ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) มากกว่า 90% ผ่านเกณฑ์การประเมิน
2. ความสัมพันธ์ (correlation) ประเมินจากค่า r_s ซึ่งได้จากการทดสอบสถิติ Spearman's rank correlation โดยเปรียบเทียบระดับความแรงของความสัมพันธ์ดังตาราง

ค่า r_s	ระดับความแรงของความสัมพันธ์
0.00-0.19	Very weak
0.20-0.39	Weak
0.40-0.59	Moderate
0.60-0.79	Strong
0.80-1.00	Very strong

3. ความแตกต่างของค่า median ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (p value < 0.05) จากการทดสอบด้วยสถิติ Wilcoxon signed rank test

	Ct real time RT-PCR	Ct-Sanity-2 RPP4	Ct-M10 Trio	Ct-QIAstat RP23
Median	29.3	24.0	25.4	30.5
Minimum	18.7	13.4	20.6	21.4
Maximum	35.6	29.3	35.8	35.4

ระวัง Dark Cycle

4. วิเคราะห์และสรุปผลการประเมิน

ชุดทดสอบ Sanity-2 RPP4 แม้จะมีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) สูง ที่ 100% อย่างไรก็ตามระดับความแตกต่างของค่า Ct ในทิศทางที่มีความไวกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า Ct ของเทคนิค Real-time RT-PCR กลับมีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลางที่ $p < 0.05$ และไม่มีความสัมพันธ์เลยเมื่อระดับ $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ จึงอาจมีความเสี่ยงต่อการเกิด False positive

ชุดทดสอบ QIAstat RP23 แม้มีความสัมพันธ์ของค่า Ct ที่สอดคล้องกับ เทคนิค Real-time RT-PCR ในระดับที่สูงมาก อย่างไรก็ตามระดับความแตกต่างของค่า Ct ในทิศทางที่มีความไวต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า Ct ของเทคนิค Real-time RT-PCR ส่งผลให้เกิด False negative ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความไว (Sensitivity) ที่พบ False negative 2 ตัวอย่าง ทำให้ค่าความไว=91.3% ในขณะที่อีก 2 ชุดน้ำยาให้ความไวที่สูงกว่า (M10 Trio=95.65%, Sanity-2 RPP4=100%)

ชุดทดสอบ M10 Trio มีความสัมพันธ์ของค่า Ct ที่สอดคล้องกับเทคนิค Real-time RT-PCR ในระดับที่สูงและระดับความแตกต่างของค่า Ct อยู่ในทิศทางที่มีความไวสูงกว่า อีกทั้งผลการทดสอบความไว (Sensitivity) และความจำเพาะอยู่ในระดับสูง คือ 95.65% และ 100% ตามลำดับ

Designed Sample panel

- ครอบคลุมประเภทตัวอย่างทั้งหมดที่ส่งตรวจห้องแล็บนั้นๆได้ จำนวนตัวอย่างมากพอใช้ประเมินได้มี
Stability, homogeneity
- ครอบคลุม คุณลักษณะของชุดตรวจนั้นๆ
- ค่านิ่งค่า **medical decision**
- ตัวอย่างนั้นควรมี **matrix** ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ตรวจจริง

			Saliva lot									%	
PCR Ct	100%	60	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<21	40	24	25	24	24	24	25	24	24	23	23		
21-22	45	27	25	23	23	23	22	21	21	22	21		
23-24	10	6	9	8	8	8	8	13	13	13	13		
>25	5	3	1	5	5	5	5	2	2	2	3		

			NPS lot											
PCR Ct	100%	60	sample	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%	
<21	40	24	24	24	27	27	28	28	27	24	24	24		
21-22	45	27	20	27	17	17	16	16	22	25	27	15	82	
23-24	10	6	12	7	12	12	11	11	7	9	7	17	95	
>25	5	3	4	2	4	4	5	5	4	2	2	4		

ผลการประเมินชุดตรวจ ATK ณ PSU*

	July 2021- July 2022		Aug 2022-2024	
	pass	(%)	pass	(%)
only Single COVID-19				
NP/NPS	60/101 ชุด	59.4	10/11 ชุด	90.91
Saliva	50/92 ชุด	54.3	7/7 ชุด	100
combo : COVID-19 plus other respiratory virus				
NP/NPS			20/27 ชุด	74.07
Saliva			1/4 ชุด	25
total	110/193	56.99	38/49	77.55
*	Prince of Songkla University			
**	oropharyngeal swab			

ข้อจำกัดการทดสอบ

- แหล่งข้อมูล : ข้อมูลอ้างอิง วิธีการตรวจ ผลการประเมินชุดตรวจ
- การจัดหาตัวอย่างที่ต้องการ **accuracy** ครอบคลุมทุกช่วงค่าการตรวจวิเคราะห์
 - Matrix of sample, new test,
- การเปรียบเทียบผลการทดสอบที่มีหลักการแตกต่างกัน การแปลผล : **Dengue Antibody**
- Calibrator, QC คืออะไร
- มีใครใช้ชุดตรวจเหมือนเราบ้าง
- อายุใช้งานของชุดตรวจ
- ราคาต้นทุน

สรุปการคัดเลือกและการทำ MV

✦ สัมมนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากลที่ขอการรับรองจากสำนักมาตรฐานห้องป

06 การทดสอบ ขั้นตอน และการประเมินผล Method Verification vs CLSI

"Qualitative Examination"

Performance Characteristic	Verification Experimental Study	CLSI*
Precision Imprecision (Random Error)	Replication experiment	EP12Ed3E
Clinical Performance or	Clinical sensitivity, specificity, PPA and NPA	
Agreement	The degree of agreement with the comparative examination	

- Reagent Stability Study (EP25AE)
- Reagent Lot Changes (EP26Ed2E)

*CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute is a globally recognized, non-profit standards development organization that promotes development and use of voluntary consensus standards and guidelines for the healthcare and medical testing community.



ดร.ธารรัตน์ ขาวเขียว

อาจารย์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล



ดร.รารัตน์ ขาวเขียว

อาจารย์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สัมมนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากลที่ขอการรับรองจากสำนักงานมาตรฐานห้องปฎิ

07

สรุป

การทวนสอบความใช้ได้
ของวิธี
(Method Verification)
ในห้องปฏิบัติการ
ทางการแพทย์

METHOD VERIFICATION IN CLINICAL LABORATORY

- เป็นการยืนยันว่าห้องปฏิบัติการสามารถยอมรับ (Accept) วิธีวิเคราะห์ว่ามีคุณสมบัติตามที่บริษัทผู้ผลิตอ้างไว้ และคุณสมบัตินั้นเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ
- เป็นเป็นข้อกำหนดตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (เช่น ISO 15189)
- สร้างความมั่นใจว่าผลการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ

การทดสอบ

- 1 Precision
- 2 Accuracy/ Bias
- 3 Measuring Interval
- 4 Reference Interval
- 5 Clinical Performance or Agreement Verification

ขั้นตอนการทวนสอบวิธี

- 1 การวางแผน - กำหนดการทดสอบที่ต้องทวนสอบและวิธีการทวนสอบ
- 2 การเก็บข้อมูล - ทำการทดสอบตามวิธีที่กำหนดและบันทึกผล
- 3 การวิเคราะห์ข้อมูล - คำนวณค่าทางสถิติเพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธี
- 4 การเปรียบเทียบกับเกณฑ์ยอมรับ - พิจารณาว่าผลการทวนสอบผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้หรือไม่
- 5 การจัดทำเอกสาร - บันทึกขั้นตอนและผลการทวนสอบทั้งหมด

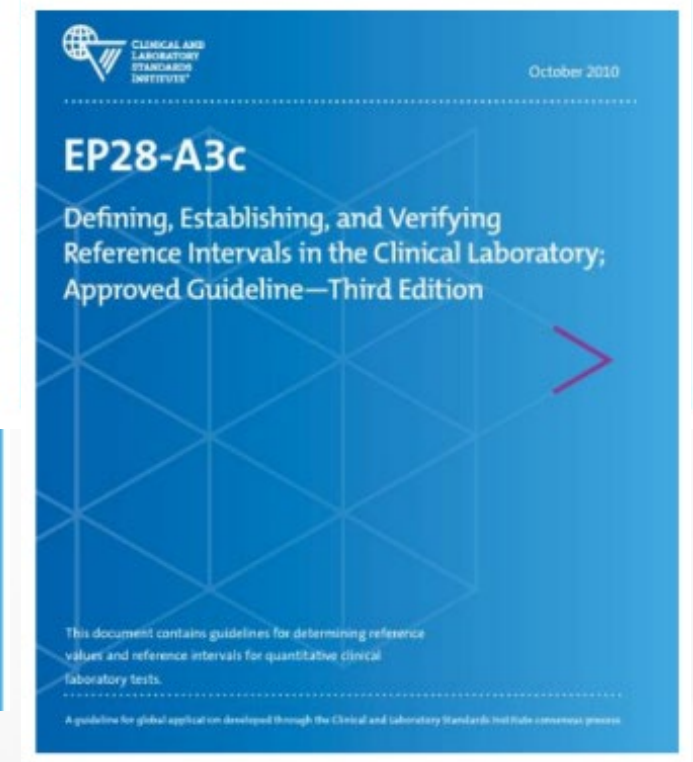
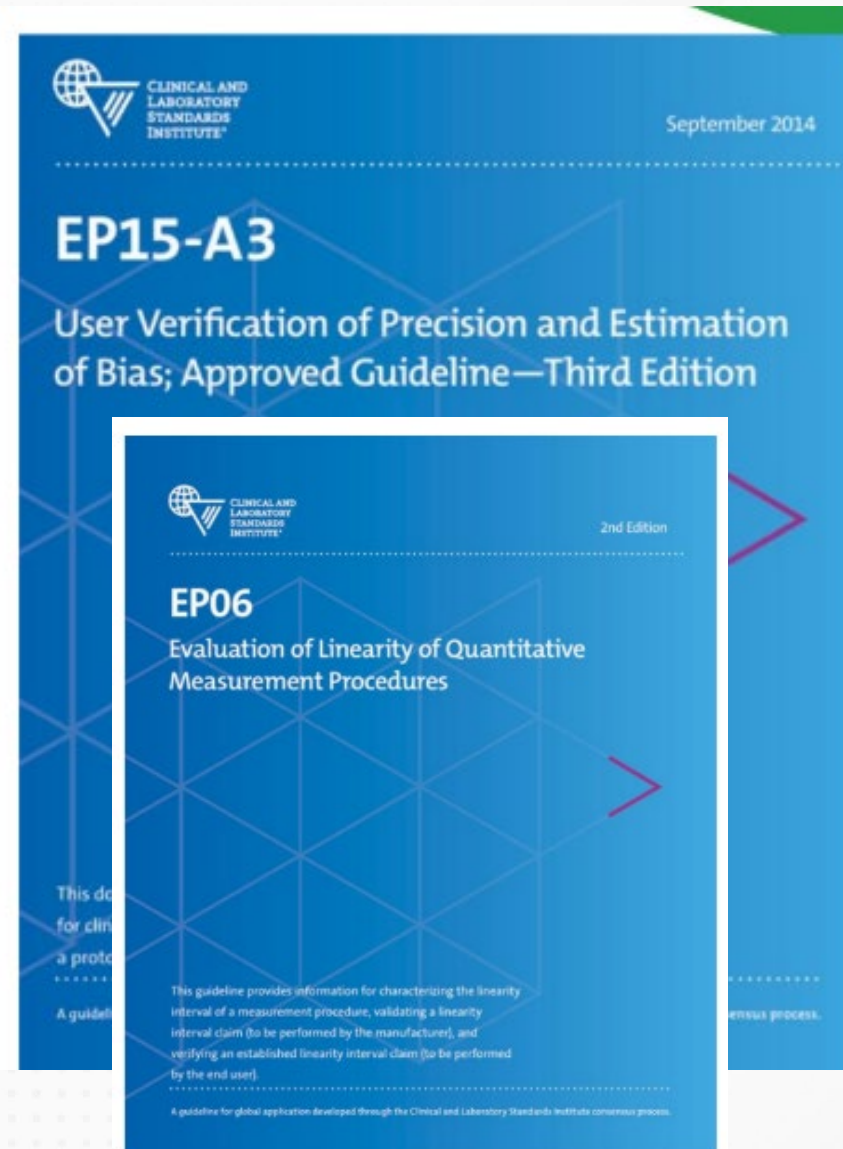
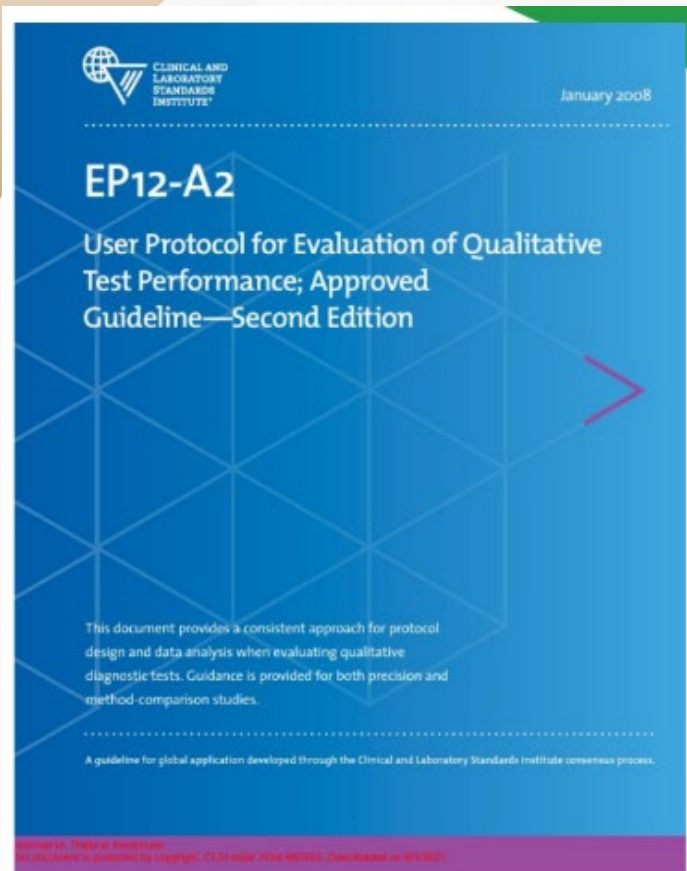
ความถี่ในการทำ

- 1 เปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์ใหม่
- 2 เปลี่ยนน้ำยาชนิดใหม่
- 3 เปลี่ยนเครื่องตรวจวิเคราะห์ใหม่
- 4 ตามกำหนดเวลาที่ระบุไว้ในเครื่องมือวิเคราะห์
- 5 ตามกำหนดเวลาที่ระบุในข้อบังคับของการขอรับรองคุณภาพการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง



คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
FACULTY OF MEDICINE PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY





เกณฑ์การคัดเลือกวัสดุและ น้ำยา

เกณฑ์การคัดเลือกวัสดุและน้ำยา ประกอบด้วย

1. A คุณสมบัติตรงตามคุณลักษณะที่กำหนด
 - มีเอกสารประกอบ
 - ไม่มีเอกสารประกอบ
2. B ราคาเหมาะสม
3. C ความเหมาะสมกับเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้อง
4. D การหลังการขาย

กระบวนการตรวจ(MT5, ISO15189 ข้อ 7)

- Lab error:Pre analytical process/Post analytical process
- Validation/Verification assay:
 - Scope assay: type of sample
 - Measuring range/ report range
 - LoD,LoQ, Medical Decision value
 - Reference range
 - Interference substances, Limitation assay
- Work instruction document
- QA: IQC/EQA

ขอบคุณครับ





คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
FACULTY OF MEDICINE PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

