วิธีปฏิบัติงานเลขที่ : RH-WI-PAT-001
เรื่อง : การตรวจหาเชื้อไวรัส เอช พี วี ด้วยชุดน้ำยา COBAS 4800 HPV Test

ผู้รับผิดชอบ	ชื่อ – สกุล	ลายเซ็น	วัน เดือน ปี
จัดทำโดย	นายธนธรณ์ มูลริยะ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์		23 มิ.ย.2564
ตรวจสอบโดย	นายวิทู กลับทวี หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค		23 มิ.ย 2564
อนุมัติโดย	นายวิบูลย์ เตชะโกศล รองผู้อำนวยการด้านทุติยภูมิและตติยภูมิ		30 มิ.ย 64

วันที่อนุมัติใช้ : 30 มิ.ย. 2564	พิมพ์ครั้งที่ : 1	แก้ไขครั้งที่ : 00	จำนวนหน้า : 10

สำเนาฉบับที่ :

เอกสารฉบับ ☑ ควบคุม ☐ ไม่ควบคุม

	โรงพยาบาลร้อยเอ็ด	วันที่อนุมัติใช้ : 30 มิ.ย. 2564	หน้าที่ : 1 / 10
		รหัสเอกสาร : RH-WI-PAT-001	แก้ไขครั้งที่ : 00
เรื่อง : การตรวจหาเชื้อไวรัส เอช พี วี ด้วยชุดน้ำยา COBAS 4800 HPV Test		ผู้จัดทำ : นายธนธรณ์ มูลริยะ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์	
ระดับเอกสาร : วิธีปฏิบัติงาน		ผู้ตรวจสอบ : หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค	
หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง : ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา		ผู้อนุมัติ : รองผู้อำนวยการด้านทุติยภูมิและตติยภูมิ	

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. วัตถุประสงค์	2
2. ขอบเขต	2
3. คำนิยามศัพท์	2
4. เอกสารอ้างอิง	2
5. ความรับผิดชอบ	2
6. เครื่องมือ/อุปกรณ์	2
7. ขั้นตอนการปฏิบัติ	3

ประวัติการแก้ไขเอกสาร

ฉบับที่	แก้ไขครั้งที่	วันที่อนุมัติใช้	รายละเอียดการแก้ไข
1	00	30 มิ.ย. 2564	

1. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติงานตรวจหา DNA ของเชื้อไวรัส HPV ในเซลล์ปากมดลูก ด้วยหลักการ Real time PCR โดยใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติ COBAS x 480/COBAS z 480

2. ขอบเขต

งานอณูพยาธิวิทยา HPV DNA testing

3. คำนิยามศัพท์

HPV DNA testing คือ การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเบื้องต้นด้วยวิธี เอชพีวี ดีเอ็นเอ เป็นการตรวจด้วยวิธีเจาะลึกระดับดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาเชื้อเอชพีวี สายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงทั้ง 14 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 16, 18 และอีก 12 สายพันธุ์

4. เอกสารอ้างอิง

คู่มือการใช้งาน Cobas 4800 System Operator's manual software version 2.2 for cobas 4800 HPV test

5. ผู้รับผิดชอบ

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีหน้าที่ ตรวจหาเชื้อไวรัส เอช พี วี ด้วยชุดน้ำยา COBAS 4800 HPV Test

6.เครื่องมือ / อุปกรณ์

6.1 เครื่องมือ/น้ำยา

6.1.1 เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ COBAS x 480/COBAS z 480

6.1.2 ชุดน้ำยา COBAS 4800 HPV test มีน้ำยา 5 ชุด ดังนี้

6.1.2.1 น้ำยาชุดที่ 1 cobas 4800 System Sample Preparation Kit ประกอบด้วย

1.) น้ำยา Magnetic glass particle เป็น น้ำยาที่ผสมอนุภาคแม่เหล็กเคลือบผงแก้ว เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

2.) น้ำยา Elution Buffer เป็นน้ำยาที่ชะกรดนิวคลีอิคออกจาก Magnetic glass particle เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

6.1.2.2 น้ำยาชุดที่ 2 cobas 4800 System Wash Buffer Kit ประกอบด้วย

1.) น้ำยาล้างบัฟเฟอร์ โคบาส 4800 เป็นน้ำยาล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยา เก็บที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส ได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

6.1.2.3 น้ำยาชุดที่ 3 cobas 4800 System Liquid Cytology Preparation Kit ประกอบด้วย

1.) น้ำยา Lysis Reagent เป็นน้ำยาสำหรับทำให้อนุภาคของไวรัสแตกตัว เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

2.) น้ำยา Proteinase K เป็นน้ำยาสลายเซลล์ ตัว เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

3) น้ำยา SDS เป็นน้ำยาสลายเซลล์ ตัว เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เก็บได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

6.1.2.4 น้ำยาชุดที่ 4 cobas 4800 HPV Amplification/Detection Kit ประกอบด้วย

1) น้ำยา HPV Master Mix เป็นน้ำยามาสเตอร์มิกซ์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เก็บได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

2) น้ำยา HPV Mg/Mn เป็นน้ำยาโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เก็บได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

6.1.2.5 ชุดน้ำยาคอนโทรล cobas 4800 HPV Controls Kit ประกอบด้วย

1) น้ำยา Positive control เป็นน้ำยาสำหรับสารควบคุมผลบวกของเชื้อเอช พี วี เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เก็บได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

2.) น้ำยา Negative control เป็นน้ำยาสำหรับสารควบคุมผลลบของเชื้อเอช พี วี เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เก็บได้นานตามวันหมดอายุข้างขวด

6.2 วัสดุอุปกรณ์

6.2.1 CO-RE Tips, 1000 µL, rack of 96

6.2.2 50 mL Reagent Reservoir

6.2.3 200 mL Reagent Reservoir

6.2.4 Deep well Plate

6.2.5 AD (microwell) Plate 0.3 mL and Sealing Film

6.2.6 Solid waste bag

6.2.7 Hamilton STAR Plastic Chute

6.2.8 ไปเปต ความจุ 1000 ไมโครลิตร

6.2.9 ทิปที่มีตัวกรองและปราศจากเอนไซม์ดีเอ็นเอส (aerosol barrier tips) ความจุ 1000 ไมโครลิตร

6.2.10 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

6.2.11 Stand-alone magnetic plate

6.2.12 น้ำกลั่น

6.2.13 70 % Ethanol

6.2.14 sterile gauze

6.2.15 Foggy

6.2.16 ถุงมือไร้แป้ง

7. ขั้นตอนการทำงาน

7.1 วิธีการและหลักการ

ใช้หลักการ Real time PCR เป็นวิธีตรวจหา DNA ของเชื้อ Human Papilloma Virus ที่อยู่ในกลุ่ม high risk (HR) สายพันธุ์ (genotype) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68

จากตัวอย่างตรวจที่มาจากเซลล์ปากมดลูก (cervical cells) โดยทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยเครื่องอัตโนมัติ COBAS x 480 และทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบโดยอัตโนมัติด้วยเครื่อง COBAS z 480 การตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์ปากมดลูกด้วยชุดน้ำยา COBAS 4800 HPV Test ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่

1). การสกัด DNA จากสิ่งส่งตรวจ (Specimen preparation) โดยใช้ MGP (Magnetic glass particles)

2). การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR Amplification) ของดีเอ็นเอคู่สม ควบคู่กับการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสของตัวตรวจจับที่มีความจำเพาะกับตัวเป้าหมาย (oligonucleotide probe)

7.2 การเตรียมสิ่งส่งตรวจ (Specimen Preparation)

ชุดตรวจโคบาส 4800 HPV test จะมีการเตรียมสิ่งส่งตรวจแบบอัตโนมัติโดยเครื่องโคบาส x 480 ใช้เทคนิคการจับกรดนิวคลิอิกด้วย MGP (Magnetic glass particles) การเตรียมสิ่งส่งตรวจนี้จะใช้เซลล์ปากมดลูก ปริมาตร 400 ไมโครลิตร โดยอนุภาคไวรัสเอชพีวี จะถูกทำให้แตกด้วยการอบที่อุณหภูมิสูงร่วมกับเอนไซม์โปรทีเนสเค และบัฟเฟอร์คาโอโทรปิก ไลซิส/บายดิ้ง (chaotropic lysis/ binding buffer) ซึ่งจะทำให้เกิดการปล่อยกรดนิวคลีอิกและเบต้า-โกลบิน DNA จากนั้นน้ำยาไลซิส (lysis reagent) และอนุภาคแม่เหล็ก (magnetic glass particles)จะถูกใส่เข้าไปในแต่ละสิ่งส่งตรวจ โดยส่วนผสมจะถูกทิ้งไว้สักระยะเพื่อให้ DNA จับกับอนุภาคแม่เหล็กสารต่าง ๆ ที่ไม่ได้จับกับอนุภาคแม่เหล็ก เช่น เกลือ โปรตีน และ เศษเซลล์จะถูกล้างออกจากอนุภาคแม่เหล็กด้วยน้ำยาล้าง หลังจากทำการแยกอนุภาคแม่เหล็กและผ่านขั้นตอนการล้างอย่างสมบูรณ์แล้ว กรดนิวคลีอิกที่ถูกจับไว้จะถูกชะ (elude) ที่อุณหภูมิสูง ซึ่ง DNA ที่ผ่านการเตรียม จะถูกเติมเข้าไปในน้ำยาสำหรับการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิก (amplification mixture) และนำเข้าเครื่องโคบาส z 480

7.3 การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR Amplification)

สิ่งส่งตรวจที่ถูกสกัดแล้วจะถูกใส่ลงในสารที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิกในถาดหลุมสำหรับเพิ่มปริมาณ (Deep well plate) ซึ่งปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะเกิดขึ้นในถาดหลุมนี้ เครื่องโคบาส x480 แอนาไลเซอร์ (COBAS x 480 Analyzer) จะทำให้น้ำยาสำหรับปฏิกิริยา (reaction mixture) เกิดความร้อนเพื่อแยกสายดีเอ็นเอคู่สม เพื่อให้เจอกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ เมื่อน้ำยาสำหรับทำปฏิกิริยาเย็นลงไพรเมอร์จะเข้าจับและทำการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอเป้าหมาย เอนไซม์ทนความร้อน EagleZ05 โพลีเมอเรส (Z05 polymerase) ร่วมกับการมีแมกนีเซียม/แมงกานีส และสารดีอ๊อกซี่นิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ที่มากพอซึ่งประกอบด้วย สารดีอ๊อกซี่อะดีโนซีน (deoxyadenosine) ดีอ๊อกซี่กัวโนซีน (deoxyguanosine) ดีอ๊อกซี่ไซทิดีน (deoxycytidine) และดีอ๊อกซี่ไธมิดีน ไตรฟอสเฟต (deoxythymidine triphosphates) จะทำให้เอนไซม์ EagleZ05 โพลีเมอเรส (Z05 polymerase) ต่อสายไพรเมอร์ออกไปตามแนวของแม่แบบเพื่อสร้างเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) ที่เรียกว่า แอมพลิคอร์น (amplicon) โดยเครื่องโคบาส x480 แอนาไลเซอร์ จะทำปฏิกิริยาซ้ำกันตามจำนวนรอบ (cycle) ที่ตั้งค่าไว้โดยแต่ละรอบของการเกิดปฏิกิริยาจะมีแอมพลิคอร์นเกิดขึ้นเป็น 2 เท่าจากจำนวนที่เริ่มต้น จำนวนรอบที่ต้องการจะถูกป้อนเข้าสู่โปรแกรมของเครื่องวิเคราะห์โคบาส x 480 การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิก (amplification) จะทำเฉพาะบริเวณยีนของเอช พี วียีโนม ยีโนมทั้งหมดของเชื้อเอช พี วี ไม่ถูกเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิก

7.4 การคัดเลือกการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิก (Selective Amplification)

การคัดเลือกการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิกเป้าหมายจากสิ่งส่งตรวจของชุดตรวจโคบาส 4800 HPV test ทำโดยใช้เอนไซม์แอมพ์อีเรส (AmpErase enzyme (uracil-N-glycosylase)) และเบสชนิด ดีออกซิยูริดีน (deoxyuridine) โดยเอนไซม์แอมพ์อีเรส จะสามารถแยกแยะและทำลายโครงสร้างของสายดีเอ็นเอที่มีเบสชนิดดีออกซิยูริดีน (deoxyuridine) แต่ไม่ทำลายสายดีเอ็นเอที่มีเบสชนิดดีออกซีไทมิดีน (deoxythymidine) โดยในธรรมชาติเบสชนิดดีออกซิยูริดีนจะไม่ปรากฏในสายดีเอ็นเอ แต่จะปรากฏในแอมพลิคอร์นที่มีการใช้ดีออกซิยูริดีน ไตรฟอสเฟส (dUTP) แทนการใช้ดีออกซีไทมิดีนไตรฟอสเฟส (dTTP) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ตัวหนึ่งในน้ำยามาสเตอร์มิค (Master Mix reagent) ดังนั้นเฉพาะแอมพลิคอร์นที่ปนเปื้อนซึ่งมี ดีออกซิยูริดีนจะถูกทำลายโดย เอนไซม์แอมพ์อีเรส ก่อนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่เกิดขึ้นหลังจากที่เริ่มการกระตุ้นเริ่มต้นของน้ำยามาสเตอร์มิค โดยแมงกานีสจะถูกทำลายด้วยเอนไซม์แอมพ์อีเรสซึ่งมีอยู่ในน้ำยามาสเตอร์ มิกซ์ จะทำลายโครงสร้างของสายดีเอ็นเอที่มีเบสดีออกซิยูริดีนอยู่ในสาย โดยเปิดสายดีออกซีไรโบสที่ตำแหน่ง C1 เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในรอบแรกของโปรแกรม ดีเอ็นเอแอมพลิคอร์นจะถูกทำลายที่ตำแหน่งเบสดีออกซิยูริดีนทำให้ดีเอ็นเอสายนั้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ เอนไซม์แอมพ์อีเรสที่เหลือจะถูกทำลายที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส นานสักช่วงเวลาหนึ่ง ทำให้ตลอดการเพิ่มจำนวนในแต่ละรอบเอนไซม์แอมพ์อีเรสไม่สามารถทำลายแอมพลิคอร์นเป้าหมายได้

7.5 การตรวจหาผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ ที่ได้จากชุดตรวจโคบาส z 480 (Detection of PCR Products in a COBAS z 480)

ชุดตรวจโคบาส 4800 HPV เทสต์จะใช้เทคโนโลยีการวัดค่าปริมาณของดีเอ็นเอคู่ผสมไปพร้อมกับการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Real Time PCR amplification) โดยใช้ตัวตรวจจับ 2 สายที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงซึ่งจะตรวจหาผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ที่ได้โดยการติดตามความเข้มของสารเรืองแสงที่เปล่งออกมา จาก reporter dye ที่จะปลดปล่อยออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิก (amplification process) ตัวตรวจจับ (probes) จะประกอบด้วยตัวตรวจจับที่จำเพาะกับเชื้อเอช พี วี และ เบต้า-โกลบิน ที่ติดฉลากด้วย reporter dye และ Quencher dye ตามหลักการ Förster-type energy transfer เมื่อเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในระหว่างเกิดการขยายสัญญาณปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสตัวตรวจจับจะเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่จำเพาะและจะถูกตัดด้วยเอนไซม์แซด05 ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (Z05 DNA polymerase) ซึ่งมีคุณสมบัติของ 5'-3' nuclease ทำให้ reporter dye หลุดห่างออกจาก quencher dye และสามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสง Fluorescence ได้ ในแต่ละรอบของปฏิกริยาพีซีอาร์จะทำให้โพรบแยกออกและมีการปล่อยแสง Fluorescence เพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบ การวัดผลิตผลของการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Real-time) โดยการวัดค่าของสารเรืองแสงของ reporter dye โดยอาศัยความยาวของคลื่นแสง (wavelengths) ที่ต่างกัน

7.6 การเก็บ การขนส่งและการรักษาตัวอย่างตรวจ (SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE)

7.6.1 การเก็บตัวอย่างตรวจ (Specimen Collection)

เก็บเซลล์ปากมดลูกใน cobas PCR Cell Collection Media, PreservCyt Solution and ThinPrep Preservative Fluid

7.6.2 การขนส่งสิ่งส่งตรวจ (Specimen Transport)

ขนส่งตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกซึ่งเก็บใน PCR Cell Collection Media, PreservCyt

Solution and ThinPrep Preservative Fluid ที่อุณหภูมิ 2-30 องศาเซลเซียส การขนส่งตัวอย่างตรวจ HPV จะต้องปฏิบัติตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารที่เป็นสาเหตุการก่อโรคของประเทศนั้น ๆ

7.6.3 การเก็บสิ่งส่งตรวจ (Specimen Storage)

สิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกซึ่งเก็บใน PCR Cell Collection Media, PreservCyt Solution สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 2-30 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 เดือนหลังการเก็บเซลล์

7.6.4 การตรวจสอบคุณภาพสิ่งส่งตรวจ

เป็นขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพก่อนดำเนินการตรวจตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ซึ่งจะบันทึกคุณภาพตัวอย่างสิ่งส่งตัวทุกรายลงในแบบฟอร์มตรวจเช็คคุณภาพของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (HPV DNA testing) เพื่อป้องกันการรบกวนการทำงานของเครื่อง ได้แก่

7.6.4.1 ตัวอย่างที่มีเลือดปน

7.6.4.2 ตัวอย่างมีปริมาตรน้อยกว่า 2 ไมโครลิตร

7.6.4.3 ตัวอย่างมีเมือกปนจะต้องใช้ไปเปตทิปเขี่ยทิ้งก่อนตรวจ

7.6.4.4 ตัวอย่างสิ่งตรวจมีลักษณะเม็ดโฟมเล็ก ๆ ซึ่งต้องใช้ไปเปตทิปเขี่ยทิ้ง

7.7 การใช้งานเครื่อง

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือการใช้งานเครื่อง COBAS x480 และการใช้งานเครื่อง COBAS z 480

7.7.1 การใช้งานเครื่อง COBAS x480

7.7.1.1 เปิดเครื่อง COBAS z 480

7.7.1.2 เปิดเครื่อง COBAS x 480

7.7.1.3 เปิดเครื่อง Heater/Shaker

7.7.1.4 เข้าสู่โปรแกรมซอฟท์แวร์ cobas 4800 โดยการใส่ชื่อผู้ใช้ (User ID) และรหัสผ่าน (pass word)

7.7.1.5 เลือก Overview tab แล้วตามด้วย cobas x 480 tab.

7.7.1.6 เลือก Run Daily Maintenance เครื่อง COBAS x480 จะทำการเตรียมความพร้อม

7.7.1.7 ทำตามขั้นตอนที่โปรแกรมเสนอไว้โดย เปิดฝาเครื่อง COBAS x480 แล้วเช็ดพื้นที่ข้างในด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย 70% Alcohol จากนั้นเช็ดอุปกรณ์ที่จะนำโหลดเข้าเครื่องด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย 70% Alcohol ทิ้งไว้ให้แห้ง

7.7.1.8 ปรับสมดุลน้ำยา ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำเข้าเครื่อง

7.7.1.9 เลือก New run tab จากนั้นเลือก “HPV Workflow”

7.7.1.10 ตั้งชื่อการ run ในช่อง “Run name” แล้วคลิก “Ok”

7.7.1.11 บรรจุ sample carrier ที่มีตัวอย่างเข้าไปใน COBAS x480 ตรงตำแหน่ง 17-34 และกด “Load Samples”

7.7.1.12 วาง Deep well plate และ microwell plate ใน Plate carrier

7.7.1.13 โหลด Plate carrier เข้าไปใน cobas x 480 ตรงตำแหน่ง 1-6

7.7.1.14 ใส่ tips rack ใน tip rack carrier และเลื่อน tip rack carrier เข้าไปใน COBAS x480ตรงตำแหน่ง 11-16 และ 35-40 กดเลือก “Load Consumables”

7.7.1.15 สแกนฉลากรหัสของขวด Wash buffer และสแกนฉลากรหัสของ 200 mL reagent reservoir จากนั้นเท Wash buffer ทั้งหมดลงใน 200 mL reagent reservoir

7.7.1.16 ใส่ 200 mL reagent reservoir carrier ตรงตำแหน่ง 48-49 ของเครื่อง COBAS x480 และกดเลือก "Load Reagent"

7.7.1.17 สแกนฉลากรหัสของขวด Elution buffer, MGP, Lysis, SDS และสแกนฉลากรหัสของ 50 mL reagent reservoir 4 กล่อง จากนั้นเทน้ำยาทั้งหมดลงใน 50 mL reagent reservoir ในแต่ละคู่ตาม ฉลากรหัส

7.7.1.18 ใส่ 50 mL reagent reservoir ใน carrier ให้ตรงตามตำแหน่งในโปรแกรมและโหลด carrier เข้าไปใน COBAS x480 ตรงตำแหน่ง 50 กดเลือก "Load Reagent"

7.7.1.19 เปิดฝาขวดน้ำยา PK สารควบคุมผลบวก สารควบคุมผลลบ HPV MMX และ HPV Mg/Mn และใส่เข้าไปใน reagent carriers ตรงตำแหน่ง 15,18,19,23 และ 24 ตามลำดับ

7.7.1.20 ใส่ reagent carrier ลงในตำแหน่ง 51 ของเครื่อง COBAS x480 กดเลือก "Load Reagent"

7.7.1.21 กด "Start Run"

7.7.1.22 กดเลือก "Unload" เพื่อนำสิ่งส่งตรวจและสารควบคุมที่ผ่านการเตรียมแล้วจาก COBAS x 480 ซึ่งอยู่ในรูปแบบ microwell plate มาปิดด้วย sealing film

7.7.2 การใช้งานเครื่อง COBAS z 480

7.7.2.1 ทำความสะอาดเครื่อง COBAS z 480 ด้านนอกด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย 70% Alcohol

7.7.2.2 กดเลือก "Next" ที่โปรแกรมซอฟท์แวร์ cobas 4800

7.7.2.3 กดปุ่มที่หน้าเครื่อง COBAS z 480 และวาง microwell plate ลงใน microwell plate loader

7.7.2.4 กดปุ่มที่หน้าเครื่อง COBAS z 480 ซ้ำอีกครั้งเพื่อโหลด microwell plate เข้าไปในเครื่อง ซึ่งเครื่องจะเริ่มทำงานทันที (Amplification and Detection)

7.7.2.5 เมื่อเครื่อง COBAS z 480 ทำงานเสร็จสิ้น ให้กดปุ่มที่หน้าเครื่อง COBAS z 480 เพื่อนำ Microwell plate ทิ้งถังขยะติดเชื้อ

7.7.2.6 กดเลือก "Show Results" ที่โปรแกรมซอฟท์แวร์ cobas 4800 ทำการพิมพ์ผลออกมาเพื่อรายงานผล

7.8 การแปลผลการทดสอบ

การรายงานผลการตรวจหา HPV DNA โดยชุดน้ำยา COBAS 4800 HPV Test

ผล (Result)	การแปลผล (Interpretation)
Other HR HPV POS, HPV16 POS, HPV 18 POS	พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16,18 และในกลุ่ม high risk สายพันธุ์ (genotype) 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68
Other HR HPV POS, HPV16 POS, HPV18 NEG	พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16 และในกลุ่ม high risk สายพันธุ์ (genotype) 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68 แต่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 18
Other HR HPV POS, HPV16NEG, HPV18 POS	พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 18 และในกลุ่ม high risk สายพันธุ์ (genotype) 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68 แต่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16
Other HR HPV POS, HPV16NEG, HPV18 NEG	พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV ในกลุ่ม high risk สายพันธุ์ (genotype) 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68 แต่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPVสายพันธุ์ 16 และ 18
Other HR HPV NEG, HPV16 POS, HPV18 POS	พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16,18 แต่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV ในกลุ่ม high risk สายพันธุ์ (genotype) 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68
Other HR HPV NEG, HPV16 NEG, HPV18 POS	พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 18 แต่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPVสายพันธุ์ 16 และในกลุ่ม high risk สายพันธุ์ (genotype) 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68
Other HR HPV NEG, HPV16 POS, HPV18 NEG	พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16 แต่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 18 และในกลุ่ม high risk สายพันธุ์ (genotype) 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68
Other HR HPV NEG, HPV16 NEG, HPV18 NEG	ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16,18 และในกลุ่ม high risk สายพันธุ์ (genotype) 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68
Invalid	ไม่สามารถแปลผลได้ ให้ทำการทดสอบซ้ำจากตัวอย่างเริ่มต้น
Failed	ไม่มีผลการทดสอบ ศึกษาการเกิด flags ในคู่มือ cobas 4800 system และทดสอบซ้ำจากตัวอย่างเริ่มต้น

7.9 ข้อควรระวัง (WARNINGS AND PRECAUTIONS)

7.9.1 ใช้สำหรับวินิจฉัยภายนอกร่างกาย

7.9.2 ชุดน้ำยาตรวจนี้ใช้กับเซลล์ปากมดลูกคนที่เก็บโดยใช้cobas® PCR Cell CollectionMedia, PreservCyt Solution และ ThinPrep Preservative Fluid

7.9.3 ไม่ใช้ปากในการดูดไปเปต

7.9.4 ปฏิบัติตามข้อควรระวังของห้องปฏิบัติการของการปฏิบัติงานประจำ คือ ห้ามกิน ดื่ม หรือสูบบุหรี่ในพื้นที่ที่จัดเตรียมไว้ใช้งาน เมื่อต้องสัมผัสกับตัวอย่างตรวจและน้ำยาให้สวมถุงมือ เสื้อคลุม และแว่นตาป้องกันไว้ หลังการสัมผัสให้ล้างมือให้ทั่ว

7.9.5 ขณะทำการแบ่งเก็บน้ำยาจากขวดควบคุมให้หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ

7.9.6 ทิ้งน้ำยาที่ไม่ใช้แล้ว ของเสียและสิ่งส่งตรวจตามกฎหมายของประเทศ เมือง หรือ หน่วยงานนั้น ๆ

7.9.7 ห้ามใช้ชุดน้ำยาภายหลังจากหมดอายุแล้ว

7.9.8 ห้ามทำการรวมน้ำยาสารควบคุมจากต่างรุ่นการผลิต (lot) หรือจากต่างขวดแต่รุ่นการผลิตเดียวกัน

7.9.9 แบบรายละเอียดความปลอดภัยขององค์ประกอบ (Material Safety Data Sheets ,MSDS) สามารถติดต่อขอรับได้จากบริษัทโรช

7.9.10 แบบรายละเอียดความปลอดภัยขององค์ประกอบ (Material Safety Data Sheets ,MSDS) สามารถติดต่อขอรับได้จากบริษัทโรช

7.9.11 แบบรายละเอียดความปลอดภัยขององค์ประกอบ (Material Safety Data Sheets ,MSDS) สามารถติดต่อขอรับได้จาก

7.9.12 สวมถุงมือทุกครั้งและต้องเปลี่ยนถุงมือระหว่างสัมผัสตัวอย่างและน้ำยาเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

7.9.13 การสัมผัสกับสิ่งส่งตรวจและน้ำยาสารควบคุมจะต้องระมัดระวังหากมีการสัมผัสกับสิ่งส่งตรวจและ สารควบคุมจะต้องปฏิบัติตามขั้นตอนความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการตามโครงร่างของความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และใน CLSI Document M29-A3

7.9.14 ห้ามให้ LYS ซึ่งประกอบด้วยกัวนิดีนไธโอไซยาเนท สัมผัสกับโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (สารฟอกขาว) ส่วนผสมดังกล่าวจะทำให้เกิดก๊าซพิษที่ร้ายแรง

7.9.15 เก็บ MGP ซึ่งประกอบด้วย Isopropanol ให้ไกลจากวัตถุติดไฟ

7.9.16 EB, SDS, HPV MMX, HPVMg/Mn, (-) C และ HPV (+) มีสารประกอบที่เป็นโซเดียม เอไซด์ ซึ่งโซเดียม เอไซด์ อาจทำปฏิกิริยากับตะกั่วและทองแดงที่สามารถทำให้เกิดการระเบิดที่รุนแรงได้และหากมีการทิ้งโซเดียม เอไซด์ ลงในอ่างล้างของห้องปฏิบัติการจะต้องปล่อยน้ำไหลผ่านเป็นจำนวนมากๆ เพื่อป้องกันการรวมตัวของเอไซด์

7.9.17 เมื่อต้องสัมผัสกับตัวอย่างตรวจและน้ำยาให้สวมถุงมือ เสื้อคลุม และแว่นตาป้องกันไว้ หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับ ชุดน้ำยาตรวจด้วยผิวหนัง ตา หรือเยื่อบุผิว หากมีการสัมผัสควรรีบล้างด้วยน้ำปริมาณมาก ๆ ทันที มิฉะนั้นอาจเกิดรอยไหม้ขึ้นได้ หากมีการหกของน้ำยาจะต้องทำการเจือจางด้วยน้ำก่อนแล้วจึงเช็ดให้แห้ง

7.9.18 พลาสติกที่ใช้แล้วทิ้ง ห้ามนำกลับมาใช้ซ้ำ

7.9.19 ห้ามใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการทำความสะอาด Cobas x 480 หรือ Cobas z 480 ให้ทำความสะอาด Cobas x 480 หรือ Cobas z 480 ตามคู่มือ Cobas 4800 system

7.9.20สำหรับข้อควรระวังเพิ่มเติม เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน จากการใช้ Cobas x 480 หรือ Cobas z 480 สามารถศึกษาได้จาก Cobas 4800 system

7.10 วิธีการปฏิบัติกรณีตัวควบคุมออกนอกเกณฑ์

รายละเอียด	สาเหตุที่อาจเป็นไปได้	แนวทางการปฏิบัติ
ตัวควบคุมชนิดบวก (R20: positive control invalid)	น้ำยาที่ใช้ทดสอบ เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำยา หรือขั้นตอนการปฏิบัติงาน	ทดสอบซ้ำด้วยน้ำยาชุดใหม่ และ ปฏิบัติตาม good laboratory practice
ตัวควบคุมชนิดลบ (R21: negative control invalid)	เกิดจากการปนเปื้อนในขั้นตอนการปฏิบัติงาน	ทดสอบซ้ำด้วยน้ำยาชุดใหม่ และ ปฏิบัติตาม good laboratory practice
Internal control (beta-globin gene) invalid	- ปริมาณสารพันธุกรรมไม่เพียงพอต่อการทดสอบ หรือปริมาณเซลล์ที่เก็บมาไม่เพียงพอต่อการทดสอบ - ตัวอย่างมีการปนเปื้อน PCR inhibitors - อุณหภูมิ ในการขนส่ง และจัดเก็บตัวอย่าง	ทดสอบซ้ำ หากยังได้ผล invalid ให้ทำการเก็บตัวอย่างใหม่เพื่อนำมาทดสอบ

ใบขอขึ้นทะเบียน / ปรับปรุงแก้ไข / ยกเลิก เอกสารคุณภาพ

ส่วนที่ 1 ผู้เสนอขอ

วันที่เสนอ 23 มิถุนายน 2564

คณะกรรมการฯ / หน่วยงาน กลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค โรงพยาบาลอ้อ

เรื่อง ☑ การขอขึ้นทะเบียนเอกสารคุณภาพ

☐ การขอปรับปรุงแก้ไขข้อความในเอกสารคุณภาพ ☐ การยกเลิกเอกสารคุณภาพ

ประเภทเอกสารคุณภาพ ☐ นโยบายคุณภาพ (Quality Manual) ☐ ระเบียบปฏิบัติ (Procedure Manual)

☑ วิธีปฏิบัติงาน (Work Instruction) ☐ เอกสารสนับสนุน (Support Document)

เอกสารคุณภาพเรื่อง การตรวจหาเชื้อไวรัส 16 ชนิด ด้วยชุดน้ำยา Cobas 4800 HPV test

รหัสเอกสารคุณภาพ RH-WI-PAT-001

เหตุผลการจัดทำ เพื่อเป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัส 16 ชนิด

☑ กรณีที่เป็นเอกสารคุณภาพขึ้นทะเบียนใหม่ ได้ส่งเอกสารคุณภาพใหม่ พร้อมไฟล์ข้อมูลมาด้วย

☐ กรณีที่เป็นการแก้ไข / ยกเลิกเอกสารคุณภาพที่เคยทำแล้ว ได้ส่งเอกสารเดิมพร้อมกับเอกสารที่จัดทำขึ้นใหม่ มาด้วย

ลงชื่อ _____ ผู้เสนอขอ

ตำแหน่ง หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค

ส่วนที่ 2 ผู้ตรวจสอบ

☑ เห็นชอบให้จัดทำเอกสาร ดำเนินการขออนุมัติ

☐ ไม่เห็นชอบ ส่งคืนผู้จัดทำ

เหตุผลและข้อเสนอแนะ _____

ตำแหน่ง (นายณรงค์ชัย สังฆา) รองผู้อำนวยการด้านพัฒนาระบบบริการและสนับสนุนบริการสุขภาพ

วันที่ ๒๔ มิ.ย. ๒๕๖๔

ส่วนที่ 3 ผู้อนุมัติ

☑ อนุมัติ

☐ ไม่อนุมัติ

เหตุผลและข้อแนะ _____

เห็นควรให้ศูนย์พัฒนาคุณภาพดำเนินการต่อไป

ลงชื่อ _____ ผู้อนุมัติ

ตำแหน่ง (นายวิบูลย์ เตชะไกศล) รองผู้อำนวยการด้านทุติยภูมิและตติยภูมิ