

รายงานการเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการด้านการตรวจ
จำแนกชนิดไวรัส โดยวิธี ELISA typing การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส
โรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี LP ELISA , NSPs test

Report of interlaboratory comparison testing on foot and mouth
disease (FMD) ELISA typing, FMD serology
by LP ELISA and NSPs test

ประจำปี 2554 ระยะเวลาดำเนินการ เดือนมีนาคม – สิงหาคม 2554



วิเคราะห์และสรุปผลโดย
สพ.ญ.วิไล ลินจงสุขงกชและคณะ

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์

รายงานการเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการด้านการตรวจจำแนกชนิดไวรัส โดยวิธี ELISA typing
การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี LP ELISA, NSPs test

Report of interlaboratory comparison testing on foot and mount disease (FMD)
ELISA typing, FMD serology test by LP ELISA and NSPs test

ประจำปี 2554 ระยะเวลาดำเนินการเดือนมีนาคม- สิงหาคม 2554

บทสรุป

การเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการด้านการตรวจสอบและวินิจฉัยวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย (FMD diagnosis) ประจำปี 2554 มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมโครงการจากภายในและต่างประเทศ รวมทั้งสิ้น 16 แห่ง เป็นห้องปฏิบัติการภายในประเทศจำนวน 9 แห่งได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ทั้ง 7 ศูนย์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และห้องปฏิบัติการต่างประเทศ จำนวน 8 แห่งได้แก่ประเทศกัมพูชา ลาว ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย พม่า บรูไนและเวียดนาม 2 แห่ง (Hanoi และ Ho Chi Minh) ภายใต้โครงการ interlaboratory comparison testing on foot and mount disease (FMD) ELISA typing ซึ่งเป็นวิธีการตรวจจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และการตรวจหาซีรัมวิทยา (FMD serology test) โดยวิธี LP ELISA and NSPs test ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, A และ Asia1 ด้วยวิธี liquid phase blocking ELISA (LP ELISA) และการตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein ต่อส่วน 3ABC NSP (PrioCheck) และ 3B NSP test (UBI) โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจากหน่วยงาน OIE Sub Regional Representative (OIE-SRR) และหน่วยงาน OIE-Regional Coordinator Unit (OIE-RCU) ภายใต้โครงการ Foot and Mouth Disease Control Campaign in South East Asia and China (SEACFMD) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ ทดสอบความชำนาญการของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และระบบคุณภาพมาตรฐานห้องปฏิบัติการของแต่ละหน่วยงาน เพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการทดสอบที่ให้ผลคงที่และมีความถูกต้องตามหลักวิชาการ ผู้รับบริการเกิดความมั่นใจและความพึงพอใจในผลการทดสอบ และเป็นการประกันคุณภาพผลการทดสอบซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของข้อกำหนดการจัดตั้งระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 นอกจากนี้ยังเป็นการยกระดับขีดความสามารถห้องปฏิบัติการให้เป็นที่ยอมรับระดับสากลโดยมีการพัฒนาและปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยทำหน้าที่เป็นผู้จัดทำ (provider) โดยได้ดำเนินการจัดเตรียมสารตรวจสอบ เตรียมตัวอย่างเชื้อและซีรัม record form , tracing sheet และ questionnaire เพื่อแจกจ่ายให้กับหน่วยงานที่ร่วมโครงการได้แก่ ELISA reagent , unknown antigen จำนวน 10 ตัวอย่าง และ unknown serum จำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อใช้สำหรับตรวจจำแนกชนิดไวรัส ด้วยวิธี ELISA typing test ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย type O, A และ Asia1 ด้วยวิธี LP ELISA และตรวจหาแอนติบอดีต่อ non structure protein โดยใช้ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 3ABC non structure protein (PrioCheck) และ 3B non structure protein (UBI) โครงการนี้เริ่มดำเนินการแจกจ่ายสารตรวจสอบและตัวอย่างให้กับทุกหน่วยงานตั้งแต่เดือนมีนาคม 2554 ถึงเดือนสิงหาคม 2554 ผลปรากฏว่าทุกหน่วยงานได้ส่งผลการทดสอบกลับมาให้ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย จำนวน 17 ศูนย์ มีการได้รับตอบกลับ questionnaire จำนวน 14 ศูนย์ ไม่ได้ส่งจำนวน 3 ศูนย์ ทุกศูนย์มีขีดความสามารถในการทดสอบ FMD serology test โดยวิธี LP ELISA และ NS test มีเพียง 9 ศูนย์ที่มีขีดความสามารถในการ

ทดสอบทั้ง antigen typing test, LP ELISA และ NSP test นอกจากนี้พบว่าห้องปฏิบัติการจำนวน 1 แห่ง คือ Lab 17 ที่ไม่สามารถอ่านผลการทดสอบได้ เนื่องจาก ค่า OD control ทั้งหมดอยู่ต่ำกว่าเกณฑ์กำหนดมาก ส่งผลให้การทดสอบตัวอย่างไม่สามารถอ่านผลได้ จึงไม่มีผลของ Lab 17 แสดงในรายงานนี้ มีเฉพาะ questionnaire เท่านั้น ส่วนรายละเอียดและสารตรวจสอบต่างๆ ที่ใช้ในโครงการมีดังนี้

1. Questionnaire จำนวน 1 ชุด
2. Unknown antigen จำนวน 10 ตัวอย่าง
3. Unknown serum หรือ Interlab sample จำนวน 5 ตัวอย่าง
4. สารตรวจสอบ LP ELISA type O, A and Asia1 ซึ่งประกอบด้วย
 - 4.1 Rabbit anti FMDV type O, A, Asia1
 - 4.2 Guinea pig anti FMDV type O, A, Asia1
 - 4.3 Concentrated inactivated FMD antigen type O, A, Asia1
5. Tracing sheet และแบบฟอร์มการตอบผล ELISA data sheet
6. คู่มือวิธีการทดสอบ ELISA typing (RRL-T-001) ,LP ELISA (RRL-T-002) NS test (PrioCheck (RRL-T-004) และ NS test (UBI) (RRL-T-003)

การตรวจสอบตัวอย่าง unknown antigen และ unknown serum ต้องทำการตรวจสอบอย่างน้อย 2 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง ทำการตอบผลลงในแบบฟอร์ม ELISA data sheet

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ได้ดำเนินการวิเคราะห์ผลเชิงสถิติ และทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆเป็นที่เรียบร้อยแล้ว พอสรุปได้เป็นหัวข้อ ดังต่อไปนี้

1. รายชื่อห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการ Interlaboratory Comparison testing จำนวนทั้งสิ้น 17 Lab โดยไม่แสดงเลขที่รหัสห้องปฏิบัติการ หรือ Lab Code ในที่นี้ ดังนี้

Table 1 แสดงรายชื่อห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการ และรายการส่งผลและ questionnaire

ลำดับที่	ชื่อศูนย์ /หน่วยงาน	Interlaboratory sample no.	ส่งผลและส่งคืน questionnaire
1	ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ * ²	Serum no. 1-5 Antigen no. 161-170	✓
2	สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ * ¹	Serum no. 41-45	✓
3	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก (ราชบุรี) * ¹	Serum no. 26-30	
4	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก (ชลบุรี) * ¹	Serum no. 11-15	✓
5	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน(ขอนแก่น) * ¹	Serum no. 36-40	✓

ลำดับที่ * ³	ชื่อศูนย์ /หน่วยงาน	Interlaboratory sample no.	ส่งผลและส่งคืน questionnaire
6	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง (สุรินทร์) * ¹	Serum no. 16-20	✓
7	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง (พิษณุโลก) * ¹	Serum no. 21-25	✓
8	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน (ลำปาง) * ²	Serum no. 6-10 Antigen no. 31-40	✓
9	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ (นครศรีธรรมราช) * ¹	Serum no. 31-35	✓
10	FMD Laboratory, Livestock Breeding & Veterinary Department, Myanmar * ²	Serum no. 61-65 Antigen no. 11-20	✓
11	Kota Bharu Regional Veterinary Laboratory Department of Veterinary Services, Malaysia* ²	Serum no. 76-80 Antigen no. 21-30	✓
12	<i>Philippine Animal Health Center Bureau of Animal Industry, Philippines</i> * ²	Serum no. 71-75 Antigen no. 61-70	✗
13	National Veterinary Research Institute (NaVRI) Department of Animal Health and Production , Cambodia * ²	Serum no. 46-50 Antigen no. 141-150	✓
14	Regional Animal Health Office , Center for Veterinary Diagnostics , Ho Chi Minh City , Vietnam * ²	Serum no. 51-55 Antigen no. 81-90	✓
15	National Animal Health Center , Department of Livestock and Fisheries, Lao PDR * ²	Serum no. 56-60 Antigen no. 181-190	✓
16	Department of Animal Health (DAH) Hanoi, Vietnam * ²	Serum no. 66-70 Antigen no. 121-130	✗
17	Veterinary laboratory Services Brunei Darussalam* ¹	Serum no. 81-85	✗ ไม่มีการส่งผลการทดสอบใหม่ให้ RRL

หมายเหตุ *1 ห้องปฏิบัติการที่มีขีดความสามารถตรวจเฉพาะแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเท่านั้น

* 2 ห้องปฏิบัติการที่มีขีดความสามารถตรวจได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

*3 ช่องหมายเลข 1-17 ไม่ใช่ชื่อรหัสห้องปฏิบัติการหรือ Lab Code

2. รายชื่อสารตรวจสอบ ตัวอย่างเชื้อและตัวอย่างซีรัม สำหรับตรวจสอบ ELISA typing , LP ELISA ซึ่งได้แจกจ่ายให้กับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เข้าร่วมโครงการ

Table 2. แสดงรายการชุดสารตรวจสอบ unknown sample และ unknown serum

Item	Name/details	Batch no.	Volume	Estimate working dilution
1 List of reagent and unknown serum for LP ELISA and NSPs test				
1.1	Rabbit anti FMDV type O189/87	005/2007	150 µl	1:5000
1.2	Rabbit anti FMDV type A118/87	006/2007	150 µl	1:5000
1.3	Rabbit anti FMDV type Asia1/85	007/2007	150 µl	1:5000
1.4	Guinea pig anti FMDV type O189/87	003/2007	250 µl	1: 2000
1.5	Guinea pig anti FMDV type A118/87	004/2007	250 µl	1: 1500
1.6	Guinea pig anti FMDV type Asia1/85	002/2007	250 µl	1: 1000
1.7	inactivated Concentrated FMD antigen type 189/87	001/2011	1.0 ml	1:500
1.8	inactivated Concentrated FMD antigen type 118/87	005/2010	1.0 ml	1:100
1.9	inactivated Concentrated FMD antigen type Asia1/85	001/2010	1.0 ml	1:100
1.10	Control C++	19/11/2010	1 ml	O = 1: 20 A = 1 :10 Asia1 = 1:15
1.11	Control C+	19/11/2010	1 ml	O = 1:80 A = 1 : 30 Asia1 = 1: 80
1.12	Control C-	14/09/2010	1 ml	O = 1: 20 A = 1 : 20 Asia1 = 1: 20
1.13	Unknown serum 5 samples for LP ELISA and NSPs	No. 1-5	1.0 ml each	
2 List of reagent and unknown antigen for ELISA typing test				
2.1	Control antigen for type O189/87	002/2009	0.5 ml	1:30
2.2	Control antigen for type A118/87	003/2010	0.5 ml	1:10
2.3	Control antigen for type Asia1 /85	002/2008	0.5 ml	1:10
2.4	Unknown antigen	No. 1-10	1.5 ml each	

3. แบบสอบถาม (Questionnaire)

ห้องปฏิบัติการทุกศูนย์ได้ดำเนินการกรอกแบบสอบถาม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของแต่ละศูนย์ในเรื่องคุณภาพบุคลากร การฝึกอบรม วิธีทดสอบ คุณภาพน้ำ การสอบเทียบและดูแลรักษาเครื่องมือ รวมทั้งสถานที่และภาวะแวดล้อมของห้องปฏิบัติการว่ามีผลกระทบต่อ การตรวจสอบหรือไม่ เพื่อให้ประกอบการประเมินผลเพื่อให้มั่นใจในผลของการตรวจสอบว่ามีความถูกต้องและเป็นไปตามหลักวิชาการ พอจะสรุปได้ดังนี้

3.1 Laboratory capacity

ขีดความสามารถห้องปฏิบัติการด้านการทดสอบและตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อย พบว่าหน่วยงานทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ มีความสามารถในการทดสอบและตรวจวินิจฉัยโรคปากและเท้าเปื่อยทาง serology test โดยวิธี LP ELISA และ NSPs test เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O, A และ Asia1 และตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อและสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนตามลำดับ ส่วนการตรวจจำแนกชนิดไวรัสหรือ typing จะใช้วิธี antigen capture ELISA เป็นหลัก ชุดสารตรวจสอบที่ใช้มีแหล่งผลิตอยู่ 2 แหล่ง คือ หน่วยงาน World Reference Laboratory (WRL), Pirbright ประเทศอังกฤษ และหน่วยงานศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ซึ่งวิธีการทดสอบดังกล่าวได้ผ่านการยอมรับในด้าน Harmonisation test method มาแล้วในการประชุมเครือข่ายห้องปฏิบัติการระดับภูมิภาคของ SEACFMD Lab network และระดับนานาชาติของ OIE FMD Reference Lab network

ชนิดของไวรัสที่ทำการตรวจสอบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์ O, A และ Asia1 เป็นหลักมีบาง lab ตรวจสอบ FMDV type C และ type อื่นๆ ด้วย ขึ้นกับความจำเป็นและสถานการณ์การระบาดภายในประเทศและในภูมิภาคในขณะนั้น เช่น Lab1 , Lab 14 และ Lab 16 เป็นต้น ส่วนวิธีทดสอบส่วนใหญ่ ได้แก่ ELISA typing test, LP ELISA , NSPs test และ RT-PCR ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับศักยภาพและขีดความสามารถของบุคลากรและห้องปฏิบัติการของแต่ละศูนย์

3.2 Micropipettes, Tips และเครื่อง ELISA Reader

ห้องปฏิบัติการทุกศูนย์มีการใช้ tips หลากยี่ห้อ เช่น biohit proline® , Micronic® , Finn tips , และอื่นๆ ในเรื่องเครื่องมือจำพวก single channel มีการใช้หลากหลายยี่ห้อ ได้แก่ Finnpipette®, Biohit proline®, Eppendorf®, Thermo ®, Socorex®, Gilson®, ขนาดปริมาตร 1-10µl, 5-50 µl, 50-250 µl , 250-1000 µl

micropipette แบบ single channel และ multi-channel micropipettes ใช้ขนาดปริมาตร 5-50µl , 50-250 µl, 250-1000 ul, Multistep 50/100/150/200µl

เครื่องอ่าน ELISA Reader ส่วนใหญ่ใช้ยี่ห้อ Multiskan EX, Labsystem Multiskan, Multiskan MS/Plus/Mx, เป็นหลัก ยี่ห้ออื่นๆ ได้แก่ Biorad , Bio-Tex, TECAN, BDSL Immunoskan และ Biotech Instrument

3.3 การทำความสะอาดและการบำรุงรักษาเครื่องมือ การจัดบันทึกอุณหภูมิเครื่องมือหลัก

ทุกศูนย์มีการทำความสะอาดและบำรุงรักษาเครื่องมือเป็นประจำ ความถี่ของการทำความสะอาดขึ้นกับการใช้งานของแต่ละห้องปฏิบัติการ ยกเว้น Lab 10, Lab 12 และ Lab 13

การสอบเทียบเครื่องมือที่สำคัญและมีผลกระทบต่อ การทดสอบ พบว่าส่วนใหญ่มีการสอบเทียบ อย่างน้อยปีละครั้ง ดังนี้

- Incubator ได้แก่ Lab 1, Lab 2, lab 3, Lab 4, Lab 5, Lab 6, lab 7, Lab 8, Lab 9, Lab 16
- Refrigerator, Freezer ได้แก่ Lab 1, Lab 2, lab 3, Lab 4, Lab 5, Lab 6, lab 7, Lab 8, Lab 9 และ Lab16
- Balance ได้แก่ Lab 1, Lab 2, lab 3, Lab 4, Lab 5, Lab 6, lab 7, Lab 8 และ Lab 9
- ELISA reader ได้แก่ Lab 1, Lab 2, lab 3, Lab 4, Lab 5, Lab 6, lab 7, Lab 8, Lab 9 และ Lab11
- Micropipettes ได้แก่ Lab 1, Lab 2, lab 3, Lab 4, Lab 5, Lab 6, lab 7, Lab 8, Lab 9 และ Lab 11

การจดบันทึกอุณหภูมิเครื่องมือหลัก พบว่าห้องปฏิบัติการภายในประเทศทั้งหมด จะมีการจดบันทึก เครื่องมือหลักที่มีผลกระทบต่อ การทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากห้องปฏิบัติการภายในประเทศทั้งหมดได้มีการนำระบบ คุณภาพห้องปฏิบัติการมาถือปฏิบัติและได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 17025 :2005 ทุกศูนย์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ส่วนห้องปฏิบัติการต่างประเทศได้แก่ Lab 11 และ Lab16 มีการจดบันทึกอุณหภูมิเครื่องมือหลักทุกวัน เช่น Incubator, refrigerator หรือ freezer ส่วนห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ยังไม่มีการจดบันทึกอุณหภูมิเครื่องมือหลัก

3.4 ระบบกระแสไฟฟ้าและเครื่องปรับอากาศ

ระบบกระแสไฟฟ้าของห้องปฏิบัติการภายในประเทศมีระบบไฟฟ้าสำรองใช้(automatic emergency power supply) เพื่อต่อเข้ากับระบบไฟฟ้าในอาคารกรณีกระแสไฟตก หรือไฟดับหรือกระแสไฟไม่ สม่าเสมอ ส่วนใหญ่มีการต่อระบบไฟฟ้าสำรองเข้ากับระบบจ่ายไฟฟ้าปกติ และมีการต่อระบบไฟฟ้าสำรองเข้ากับ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ แต่บางศูนย์เช่น Lab 2 และ Lab 6 ไม่มีการต่อกระแสไฟฟ้าสำรองเข้ากับ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ ได้แก่ ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อ การทดสอบเมื่อเกิดไฟฟ้ดับ สำหรับ เก็บรักษาตัวอย่างและสารตรวจสอบ ห้องปฏิบัติการในต่างประเทศที่มีการต่อระบบไฟฟ้าสำรองได้แก่ Lab 11 และ Lab 16 เท่านั้น

ด้านภาวะแวดล้อมของห้องปฏิบัติการที่มีผลกระทบต่อ การทดสอบ เช่นอุณหภูมิห้อง พบว่ามีการ เปิดเครื่องปรับอากาศในขณะที่ทำการตรวจสอบ ทุกศูนย์มีการปรับอุณหภูมิพอเหมาะประมาณ 24-25 °C โดย เปิดเครื่องปรับอากาศตลอดวัน

3.5 ระบบผลิตน้ำบริสุทธิ์ภายในศูนย์

ทุกศูนย์มีระบบผลิตน้ำบริสุทธิ์ภายในศูนย์เอง ยกเว้น Lab 4 ที่ยังไม่มียระบบผลิตน้ำบริสุทธิ์ ต้อง ขอสนับสนุนจากหน่วยงานภายนอก ส่วนใหญ่ขอจากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ปากช่อง นครราชสีมา

3.6 คู่มือวิธีการตรวจสอบ

ส่วนใหญ่ใช้คู่มือวิธีการทดสอบของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ที่จัดทำขึ้น สำหรับใช้ เป็นคู่มือมาตรฐานในระบบคุณภาพตามข้อกำหนด ISO 17025 :2005 รวมทั้งหน่วยงานจากต่างประเทศใน Lab 10 Lab 12 และ Lab 13 ซึ่งจัดทำเป็นภาษาอังกฤษ ยกเว้นหน่วยงานใน Lab 16 ใช้คู่มือของ World Reference Laboratory (WRL) , Pirbright Laboratory, UK กรณี Lab 11 ใช้คู่มือของ WRL, UK และของ Australian Animal Health Laboratory (AAHL), ออสเตรเลีย

3.7 การเก็บรักษาตัวอย่างและสารตรวจสอบ

เก็บตัวอย่างซีรัม ตัวอย่างเชื้อไวรัสและสารตรวจสอบในตู้แช่แข็ง -20°C และ -80°C โดยใช้หลอดทนความเย็น (cryotube) มีบางศูนย์ใช้หลอดธรรมดาโดยเก็บเฉพาะในตู้เย็น 4°C และตู้แช่แข็ง -20°C

3.8 การสอบเทียบเครื่องมือหลักที่มีผลกระทบต่อ การทดสอบได้แก่ Incubator, micropipette และ ELISA Reader ห้องปฏิบัติการแต่ละศูนย์ มีการได้ส่ง Micropipettes และ ELISA reader สำหรับ ทวนสอบหรือสอบเทียบ ส่วนเครื่องมืออื่นๆ เช่น Incubator ตู้เย็น และตู้แช่แข็ง มีการสอบเทียบทุกปีจากหน่วยงานที่ได้รับรอง ISO17025 ด้านการสอบเทียบ เช่นบริษัทปูนซิเมนต์ไทยกรุ๊ป (SCG) และสถาบันอาหาร (National Food Institute) เป็นต้น Lab 1, Lab 2 , Lab 6, Lab 9 มีการทวนสอบ micropipettes และ ELISA reader แบบ In house Calibration โดยส่งไปทวนสอบที่หน่วยงานศูนย์อ้างอิงปากและเท้าเปื่อยซึ่งใช้ standard ELISA plate ที่ส่ง calibrate ต่างประเทศทุกปี บางศูนย์ส่งทวนสอบโดยใช้บริการของบริษัทที่จัดซื้อ เครื่องมือดังกล่าว Lab 11 และ Lab 16 มีการส่งสอบเทียบทุกปีแต่ไม่ระบุหน่วยงานที่รับสอบเทียบ ส่วน Lab 10, Lab 12 และ Lab 13 ยังไม่เคยมีการทวนสอบหรือสอบเทียบเครื่องมือสำคัญได้แก่ Incubator, micropipette , ELISA Reader ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง เนื่องจากขาดการสนับสนุนเรื่องงบประมาณและไม่มีหน่วยงานภายนอกมารับสอบเทียบ

3.9 การแปลผลการตรวจสอบและคำนวณค่า antibody titer

ส่วนใหญ่อ่านผลโดยใช้ค่า raw data จากเครื่อง ELISA Reader โดยตรง และส่งข้อมูลเข้าเครื่อง computer โดยใช้ program ของ CSIRO (ซึ่งเขียนโดย Dr. Stuart Blacksell and Mr. Chris Morissy) หรือโปรแกรมที่มากับตัวเครื่อง โดยใช้ร่วมกับโปรแกรม excel spread sheet ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ได้แก่ Lab 1, Lab 2, Lab 4, Lab 5, Lab 6, Lab 7, Lab 8, Lab 9, Lab 10, Lab11, Lab 12 และ Lab 13 ส่วน Lab 16 ใช้โปรแกรม ProComm computer program

ทุกศูนย์มีการถ่ายโอนข้อมูลจาก computer นำไปวิเคราะห์ผล antibody titer โดยใช้ Excel spread sheet ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยจัดทำขึ้น ซึ่งได้มีการจัดฝึกอบรมและฝึกสอนให้ทุกศูนย์ได้ใช้ เป็นรูปแบบเดียวกันทั้งหมด

3.10 การจัดทำ Internal quality control (IQC) และการวิเคราะห์ค่า IQC data

ทุกศูนย์ส่วนใหญ่มีการใส่ control panel ซึ่งประกอบด้วย strong positive control (C++), weak positive control (C+), Negative control (C-) และ Antigen control (Ca) ลงบนทุกเพลต ของการทดสอบแต่ละครั้ง มีการประเมินค่า IQC ของการทดสอบแบบประจำวันหรือบางครั้งรวบรวมทุก 40 เพลต ย้อนหลังทุกๆ 2 เดือน เพื่อจัดสรุปเป็นแผนภูมิเพื่อดูแนวโน้มของ control แต่ละชนิดยังอยู่ในเกณฑ์กำหนดที่ยอมรับหรือไม่

ข้อเสนอแนะและความต้องการด้านฝึกอบรมของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ จากแบบสอบถาม

- 1) ห้องปฏิบัติการบางแห่ง เช่น Lab2, Lab 6, Lab 9 ขอให้มีการจัดโครงการฝึกอบรมด้าน quality assurance เพื่อแก้ปัญหาด้านเทคนิคการทดสอบ และเพิ่มประสบการณ์ อย่างน้อยปีละครั้ง
- (2) Lab 12 มีความประสงค์และมีความจำเป็นต้องการในการจัดทำ quality assurance control system อย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากเป็นหน่วยงานที่ทำหน้าที่เป็น national laboratory ของประเทศ
- (3) Lab 13 ต้องการเข้ารับการฝึกอบรมด้าน FMD diagnosis เพิ่มขึ้น รวมทั้งฝึกอบรมด้าน quality assurance ของการทดสอบทั้งด้าน antigen typing และ LP ELISA
- (4) Lab 10 และ Lab 13 มีความประสงค์ให้มีการจัด Interlaboratory comparison program ประจำปีอย่างต่อเนื่องและยินดีความร่วมมือโครงการเช่นนี้อีก

4.

การทดสอบ

ด้านการตรวจหาและจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไซปัส ไอ เอ และเซียวัน

โดยวิธี Antigen capture ELISA หรือ ELISA typing test ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3

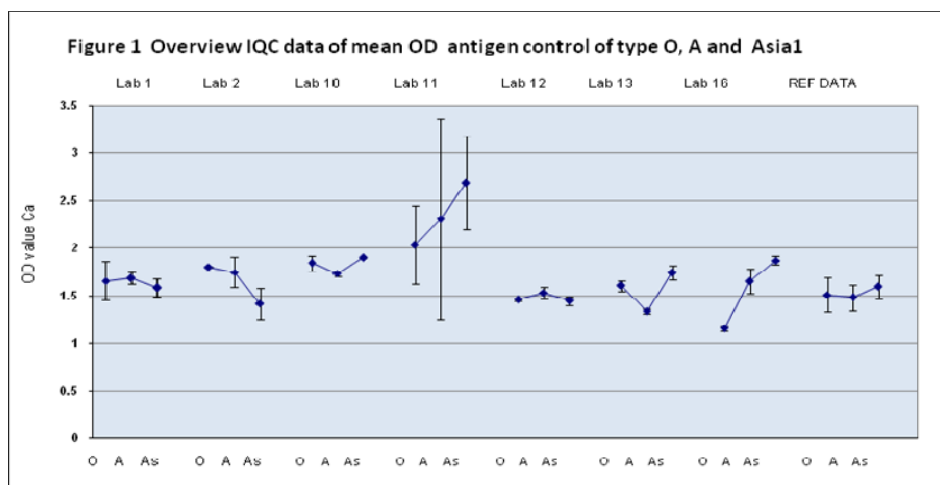
Table 3. แสดงผลการทดสอบและค่า OD ของตัวอย่าง และ control ที่ dilution 1:1

Lab Code			Result of antigen typing test				
sample no.	OD	result	Mean control antigen	sample no	OD	result	control antigen
Lab 161	0.01	NVD		Lab 81	0.0	NVD	
162 (1:10)	1.67	O	O = 1.66	82 (1:10)	2.31	O	O = 2.04
163 (1:10)	0.97	A	A = 1.68	83 (1:10)	1.06	A	A = 2.307
164 (1:4)	1.08	Asia1	Asia1 = 1.58	84 (1:4)	2.40	Asia1	Asia1 = 2.69
165 (1:4)	1.44	A		85 (1:4)	2.07	A	
166 (1:15)	0.76	A		86 (1:15)	0.42	A	
167 (1:15)	0.67	Asia1		87 (1:15)	1.31	Asia1	
168 (1:80)	0.63	O		88 (1:80)	0.43	O	
169 (1:10)	0.97	Asia1		89 (1:10)	1.30	Asia1	
170 (1:40)	0.79	O		90 (1:40)	0.62	O	
Lab 31	0.09	NVD		Lab 181	0.01	NVD	
32 (1:10)	2.09	O	O = 1.805	182 (1:10)	1.18	O	O = 1.46
33 (1:10)	1.45	A	A = 1.75	183 (1:10)	0.81	A	A = 1.535
34 (1:4)	1.83	Asia1	Asia1 = 1.42	184 (1:4)	1.13	Asia1	Asia1 = 1.45
35 (1:4)	2.02	A		185 (1:4)	1.22	A	
36 (1:15)	0.58	A		186 (1:15)	0.85	A	
37 (1:15)	1.84	Asia1		187 (1:15)	0.49	Asia1	
38 (1:80)	0.70	O		188 (1:80)	0.24	O	
39 (1:10)	1.40	Asia1		189 (1:10)	0.67	Asia1	
40 (1:40)	1.32	O		1970 (1:40)	0.47	O	
Lab 141	0.01	NVD		Lab 11	0.0	NVD	
142 (1:10)	2.05	O	O = 1.845	12 (1:10)	1.63	O	O = 1.86
143 (1:10)	1.32	A	A = 1.74	13 (1:10)	0.35	A	A = 1.975
144 (1:4)	2.22	Asia1	Asia1 = 1.905	14 (1:4)	0.51	Asia1	Asia1 = 1.215
145 (1:4)	2.04	A		15 (1:4)	0.92	A	
146 (1:15)	1.07	A		16 (1:15)	0.45	A	
147 (1:15)	1.65	Asia1		17 (1:15)	1.09	Asia1	
148 (1:80)	0.91	O		18 (1:80)	0.14	NVD	
149 (1:10)	1.79	Asia1		19 (1:10)	0.65	Asia1	
150 (1:40)	1.36	O		20 (1:40)	0.35	O	

Lab Code			Result of antigen typing test				
sample no.	OD	result	Mean control antigen	sample no	OD	result	control antigen
Lab 21	0.12	NVD		REF DATA 1	0.03	NVD	
22 (1:10)	0.72	O	O = 1.158	2 (1:10)	1.07	O	O = 1.513
23 (1:10)	0.46	A	A = 1.657	3 (1:10)	0.66	A	A = 1.483
24 (1:4)	0.87	A	Asia1 = 1.58	4 (1:4)	1.32	Asia1	Asia1 = 1.59
25 (1:4)	0.77	A		5 (1:4)	0.93	A	
26 (1:15)	0.18	NVD		6 (1:15)	0.62	A	
27 (1:15)	0.29	Asia1		7 (1:15)	0.74	Asia1	
28 (1:80)	0.16	NVD		8 (1:80)	0.36	O	
29 (1:10)	0.21	NVD		9 (1:10)	1.05	Asia1	
30 (1:40)	0.13	NVD		10 (1:40)	0.65	O	

Remark NDV = no virus detected

Figure 1. แสดงค่า IQC ของ OD antigen control type O, A, Asia1 ที่ dilution 1:1, ของแต่ละห้องปฏิบัติการ โดยค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับจะมีค่า OD ช่วง 1.3-1.8



เป็นค่าเฉลี่ยของ OD ที่ตรวจสอบ 2 ครั้ง นำค่าเฉลี่ย ของแต่ละ Lab มานำเสนอในรูปแบบ แผนภูมิของค่า Mean \pm 1 SD สรุปโดยภาพรวมพบว่าส่วนใหญ่ค่า OD ของ antigen control จัดอยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนด คือมีค่าระหว่าง OD 1.3-1.8 ยกเว้น lab 11 ได้ค่า OD ของ antigen control Type O, A และ Asia1 สูงเกินเกณฑ์กำหนดคือ 2.04, 2.307 และ 22.69 ตามลำดับ

4.1 สรุปผลโดยภาพรวมและข้อเสนอแนะจากผลการตรวจจำแนกชนิดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยวิธี ELISA typing ของแต่ละห้องปฏิบัติการ มีรายละเอียดดังนี้

4.1.1 ผลการทดสอบ ELISA typing จากตัวอย่าง unknown sample ทั้งหมด 10 ตัวอย่างของแต่ละ Lab ซึ่งมีเพียงจำนวน 8 Lab เท่านั้น ได้แก่ Lab 1, lab 2, Lab 10, lab11, lab 12 , lab 13, lab 16 และค่า REF DATA พบว่าส่วนใหญ่ให้ผลสอดคล้องกันรวมถึงค่า REF DATA ด้วย มีเพียง Lab 16 ซึ่งผลการทดสอบ sample no. 21-30 พบว่ามีบางตัวอย่างได้ผลการทดสอบเป็นลบหรือ No virus detected (NVD) ใน sample no. 26, 28, 29 และ 30 ซึ่งควรได้ผลเป็นผลบวกหรือ positive type A, O, Asia1 และ O ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจาก weak reaction ในขบวนการทดสอบ ขอเสนอแนะให้ตรวจสอบกระบวนการทดสอบ สภาวะ pH สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่สำคัญที่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบ เป็นต้น

4.1.2 ค่า IQC ของ antigen control พบว่าทุก lab มีการ set control panel ของ Type O, A และ Asia1 ลงในแต่ละ plate ของกระบวนการทดสอบ เพื่อเป็นการประกันคุณภาพผลการทดสอบ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1 (Figure 1) เป็นค่า OD ของ control antigen type O, A , Asia1 ซึ่งควรอยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนดคือช่วง 1.3-1.8 เป็นหลัก แต่ยังพบว่า Lab 10 มี OD ของ antigen control type O และ Asia1 สูงกว่าเกณฑ์กำหนด คือ 1.845 และ 1.905 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า Lab 11 มี OD ของ antigen control type O A และ Asia1 สูงกว่าเกณฑ์กำหนดมากคือ 2.04, 2.307 และ 2.69 ตามลำดับ

4.1.3 unknown sample ทั้ง 10 ตัวอย่างนั้น เวลามาไปทำการทดสอบโดยเจือจางเป็น 3 dilution ที่ 1:1, 1:2, 1:4 นั้น ปรากฏว่าบางห้องปฏิบัติการได้ค่า OD สูงมาก คือ OD มากกว่า 2.0 ทั้งนี้อาจมาจาก reagent เป็น inactivated antigen ต้องทำการเจือจางตาม working dilution ที่แนะนำในเอกสาร list of reagent ที่ส่งให้กับทุกศูนย์ แต่บางศูนย์อาจไม่ได้ใช้ working dilution ตามที่แนะนำ จึงทำให้ได้ค่า OD สูงจากเกณฑ์กำหนด หรือบางศูนย์ได้ค่า OD control สูงเกินไป เป็นต้น นอกจากนี้ยังขึ้นกับภาวะแวดล้อมหรือสิ่งอำนวยความสะดวกอื่นๆ เช่น การเก็บ reagent และตัวอย่างในตู้เย็นหรือตู้แช่แข็งที่เหมาะสม การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ระมัดระวังการใช้อุปกรณ์ micropipette ที่มีประสิทธิภาพในการเจือจางและเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคที่ถูกต้อง อาจช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้

5. สรุปผลการวิเคราะห์ด้านการตรวจสอบแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ เอ และเอเซียวัน โดยวิธี LP ELISA และ NSP Test ดังนี้

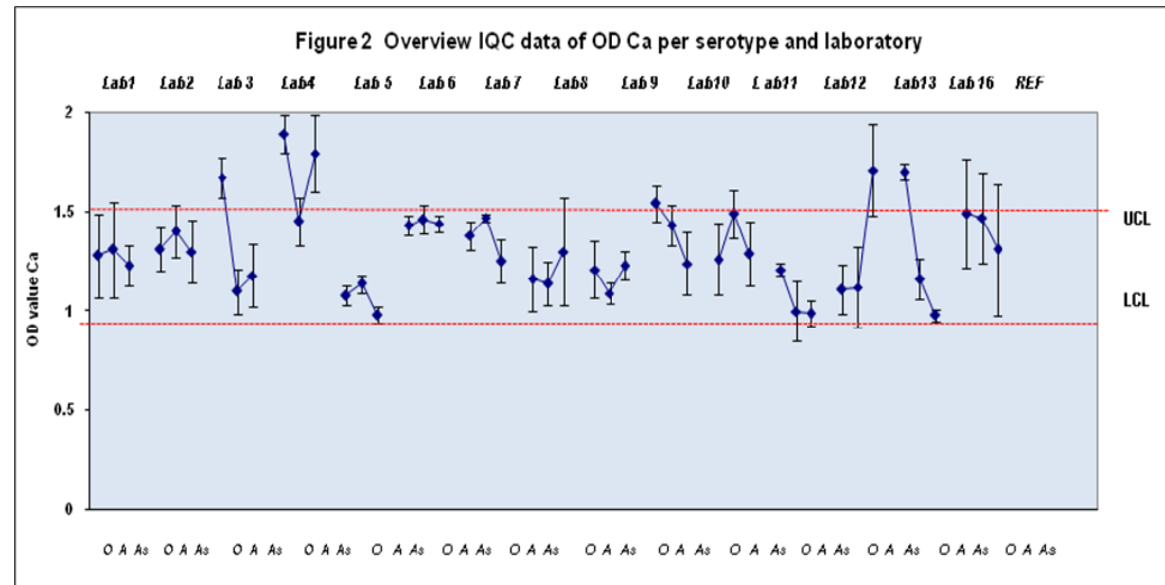
5.1 ผลการวิเคราะห์ IQC data ของค่า OD antigen control (OD Ca), Percent Inhibition (%PI) ของ positive control serum C++, C+ และ negative control serum (C-) ดังแสดงใน Figure 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ (ไม่มีข้อมูลของ Lab 6 เนื่องจากอ่านผลไม่ได้)

Table 4 แสดงค่า IQC limit ที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

	LCL	UCL
Ca (OD)	0.9	1.5
C++	90	100
C+	50	90
C-	0	49

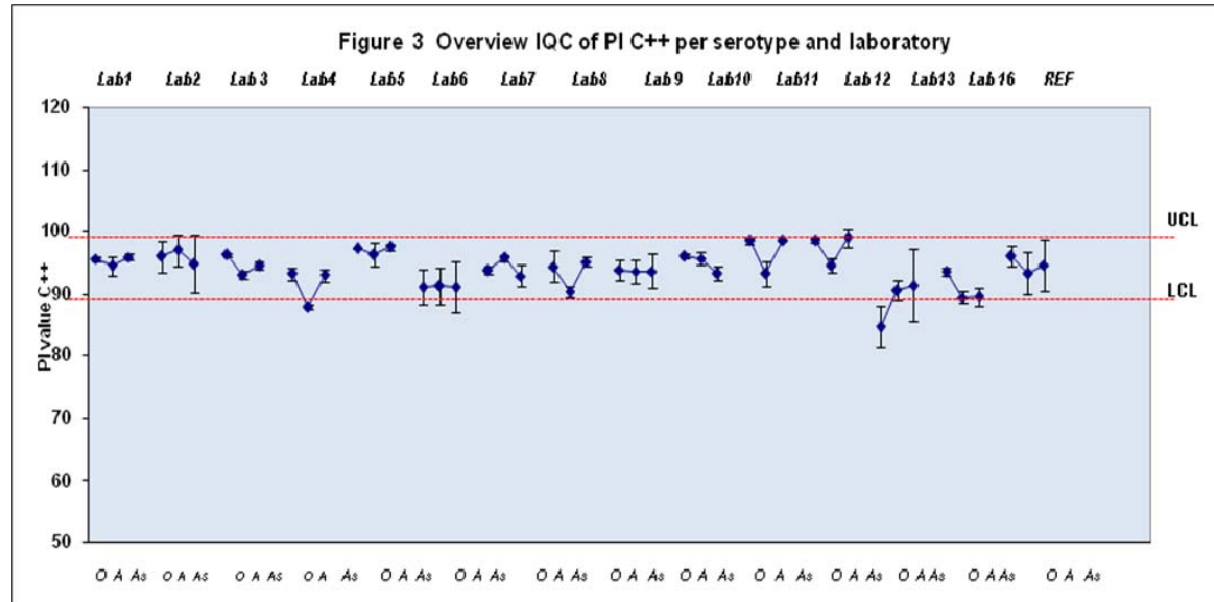
LCL = Lower control limit, UCL = Upper control limit

Figure 2 แสดงค่า IQC data ของค่า OD antigen control (OD Ca) ของไวรัส ไทป์ โอ เอ และเอเซียวัน



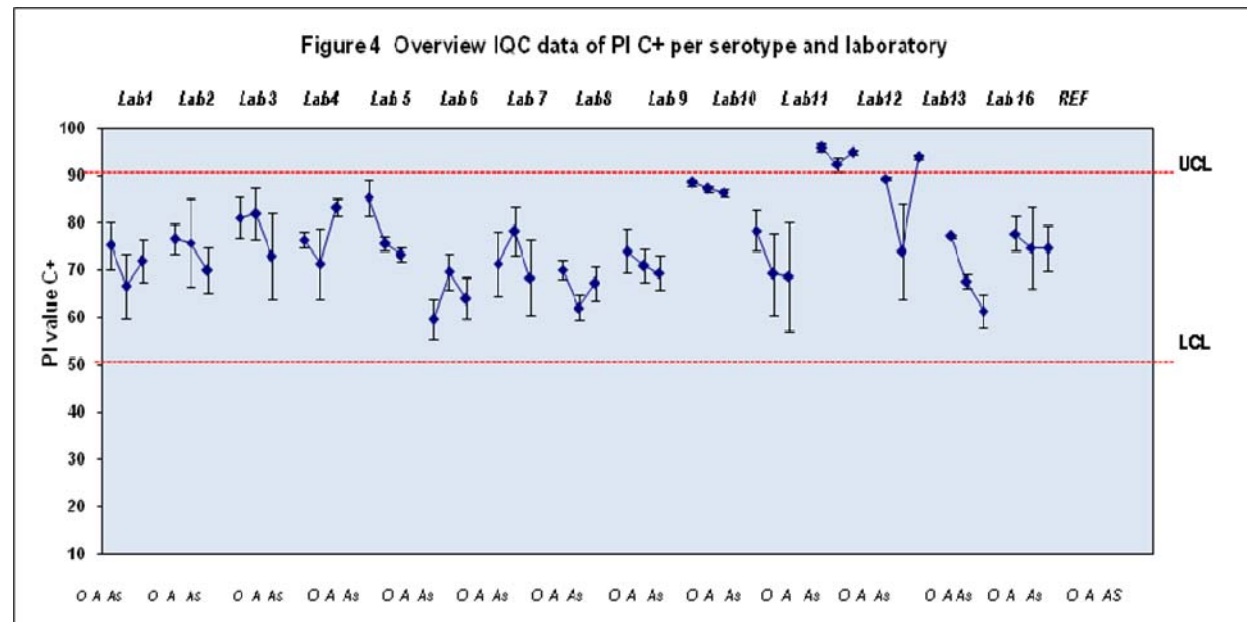
เป็นค่าเฉลี่ยของ OD ของ antigen control ในแต่ละ Lab มานำเสนอในรูปแบบแผนภูมิของค่า Mean \pm 1 SD สรุปโดยภาพรวมพบว่าส่วนใหญ่ค่า OD ของ antigen control จัดอยู่ในช่วงที่เกณฑ์กำหนด คือมีค่าระหว่าง OD 0.9 -1.5 พบว่า Lab 3 เฉพาะไทป์โอ ค่า OD สูงกว่าเกณฑ์กำหนด Lab 4 ค่า OD ของ ไทป์โอ และเอเซียวัน สูงเกินค่าเกณฑ์กำหนด ส่วนไทป์เอ มีแนวโน้ม OD จะสูง อาจเนื่องมาจากมีการปรับค่า working dilution โดยไม่ได้ตรวจสอบ antigen titration ก่อนนำมาใช้ทดสอบ เช่นเดียวกับ Lab 13 และ Lab 16 มีค่า OD ของไทป์ เอเซียวันและไทป์โอ อยู่สูงกว่าเกณฑ์กำหนดเพียงเล็กน้อยแต่ยังไม่มีผลกระทบต่อการศึกษา

Figure 3 แสดงค่า IQC data ของค่า PI C++ ของไวรัส ไทป์ โอ เอ และเอเซียวัน



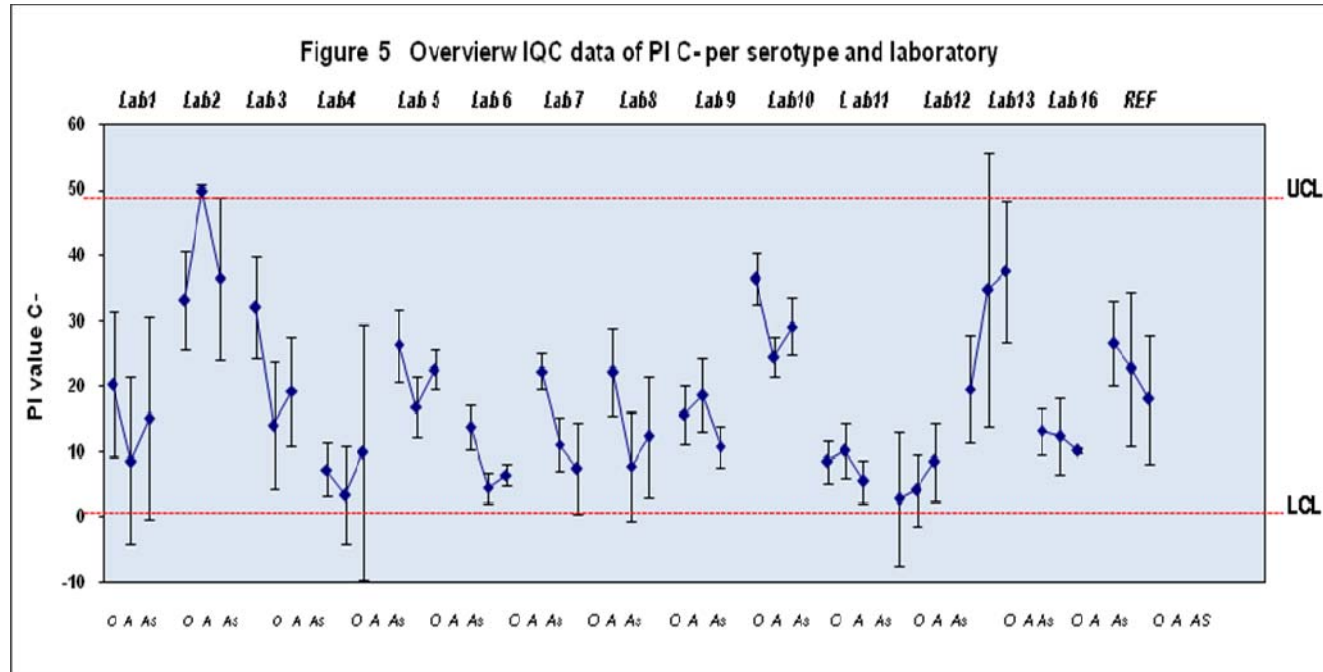
สรุปโดยภาพรวมค่า PI อยู่ในช่วงเกณฑ์ที่กำหนดคือ 90 -100 % ทั้งหมด มีเพียง Lab 13 ค่า PI C++ ไทป์โอต่ำกว่าเกณฑ์เพียงเล็กน้อยแต่ไม่มีผลทำการทดสอบ

Figure 4 แสดงค่า IQC data ของค่า PI C+ ของไวรัส ไทป์ โอ เอ และเอเซียวัน



สรุปโดยภาพรวมค่า PI C+ อยู่ในช่วง 50-90 ทุกศูนย์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด ยกเว้น Lab 12 ค่า PI C+ ทั้ง 3 ไทป์ สูงกว่าเกณฑ์กำหนด Lab 13 ไทป์เอเซียวัน สูงกว่าเกณฑ์กำหนดเล็กน้อย แต่ไม่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบ

Figure 5 แสดงค่า IQC data ของค่า PI C- ของไวรัส ไทป์ โอ เอ และเอเซียวัน



สรุปโดยภาพรวมค่า PI C- อยู่ในช่วง 0-50 % ทุกศูนย์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด

Figure 6. แผนภูมิแสดงค่า Modified Youden plot ค่า PI ของ sample 3 และ sample 5 ของไทป์ โอ

นำค่า PI ของ sample 3 และ sample 5 ทุก Lab นำมา plot ค่าจุดตัดระหว่างแกน X และ แกน Y และหาค่า mean \pm 1SD เทียบกับค่า Reference data (REF) สรุปโดยภาพรวม youden plot ของแต่ละ Lab และค่า ของ REF data พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในเขตพื้นที่เกณฑ์เฉลี่ย ยกเว้น Lab 11, Lab 12 และ Lab 16 เป็นที่น่าสังเกตว่า Lab 7 มีการค่า PI เบี่ยงเบนไปจากค่าเกณฑ์เฉลี่ยมาก เมื่อตรวจสอบรายละเอียดในผลการทดสอบ พบว่ามี systematic error ของขบวนการทดสอบ ทำให้เกิดผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ไม่เป็นไปตามที่กำหนด คือ พบว่าค่า LP ELISA titer ต่ำกว่า Lab อื่นๆ และต่ำกว่าค่าอ้างอิง

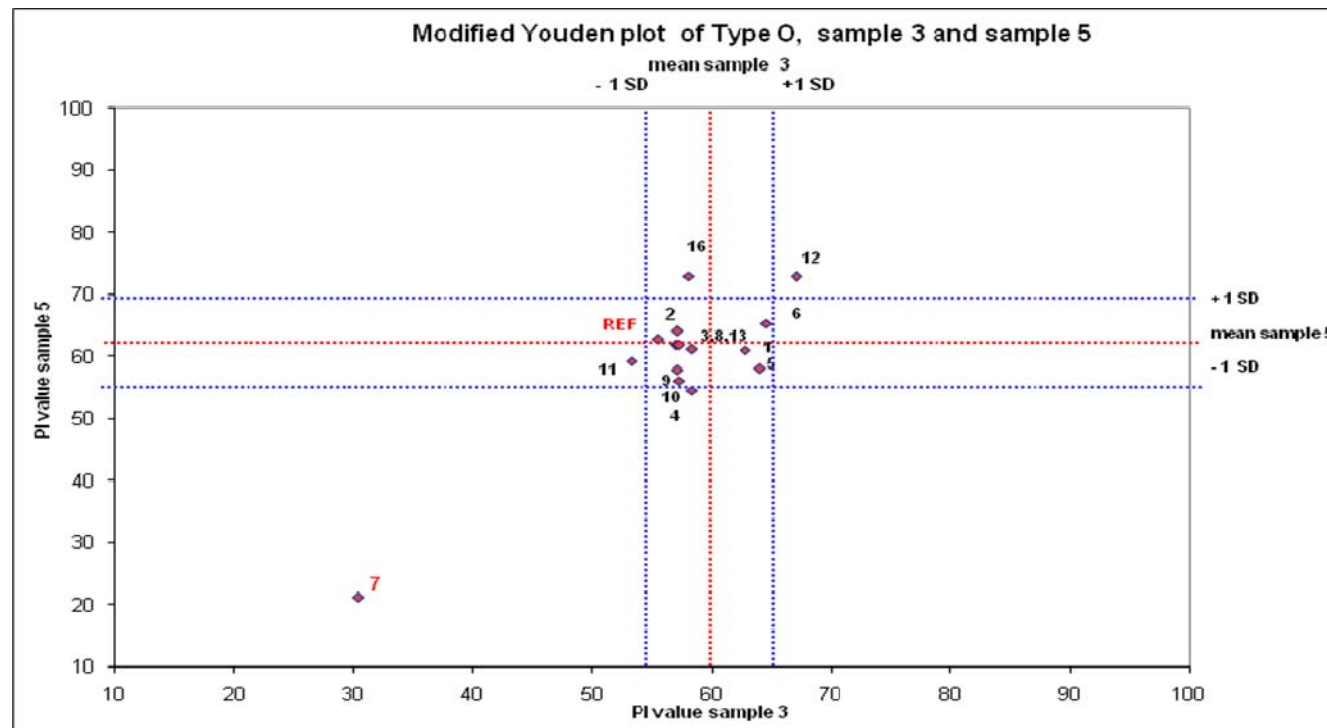


Figure 7. แผนภูมิแสดงค่า Modified Youden plot ค่า PI ของ sample 4 และ sample 2 ของไทป์เอ

นำค่า PI ของ sample 4 และ sample 2 ทุก Lab นำมา plot ค่าจุดตัดระหว่างแกน X และ แกน Y และหาค่า mean \pm 1SD เทียบกับค่า Reference data (REF) สรุปลงโดยภาพรวม youden plot ของแต่ละ Lab และค่า ของ REF. พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในเขตพื้นที่เกณฑ์เฉลี่ย ยกเว้น Lab 2, Lab 4, Lab 11, Lab 12 และ Lab 16

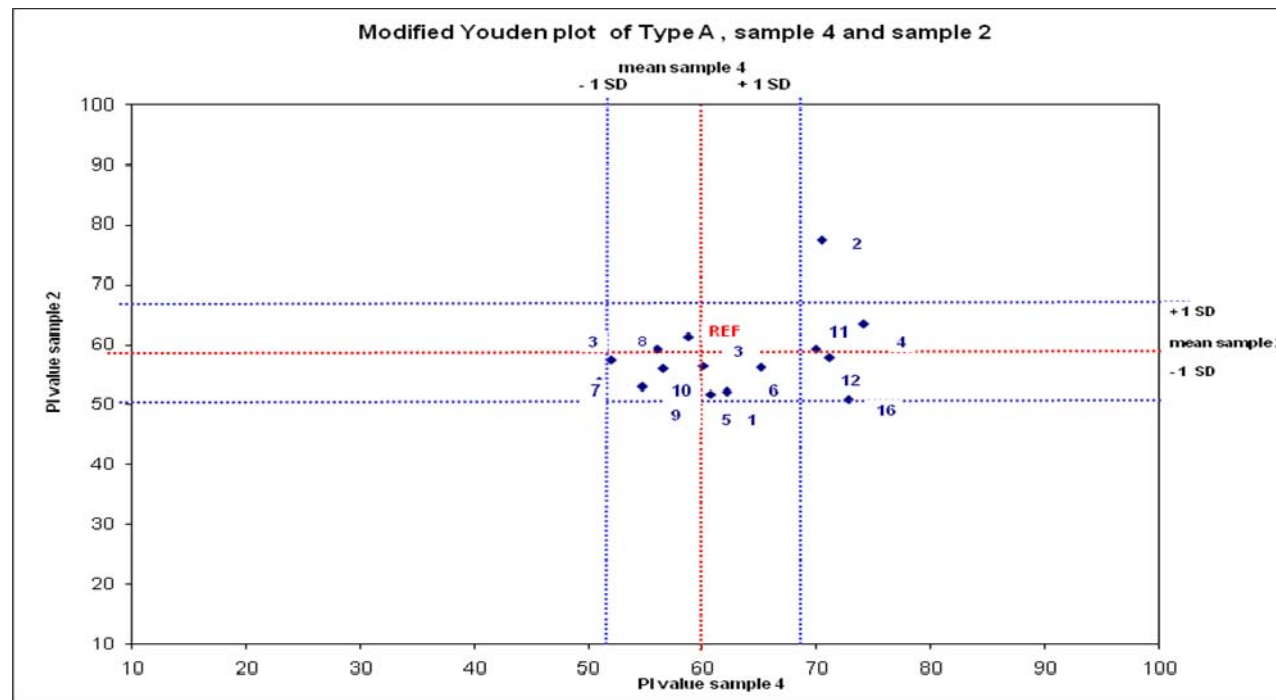


Figure 8. แผนภูมิแสดงค่า Modified Youden plot ค่า PI ของ sample 2 และ sample 4 ของไทป์เอเชียวัน

สรุปโดยภาพรวม ค่า PI ของแต่ละ Lab ยังมีการกระจายของ Lab 2, Lab 4, Lab 6 และ Lab 10 อยู่นอกเขตพื้นที่เกณฑ์เฉลี่ย เนื่องจากมีการกระจายข้อมูลต่างไปจากค่า reference data ของ RRL

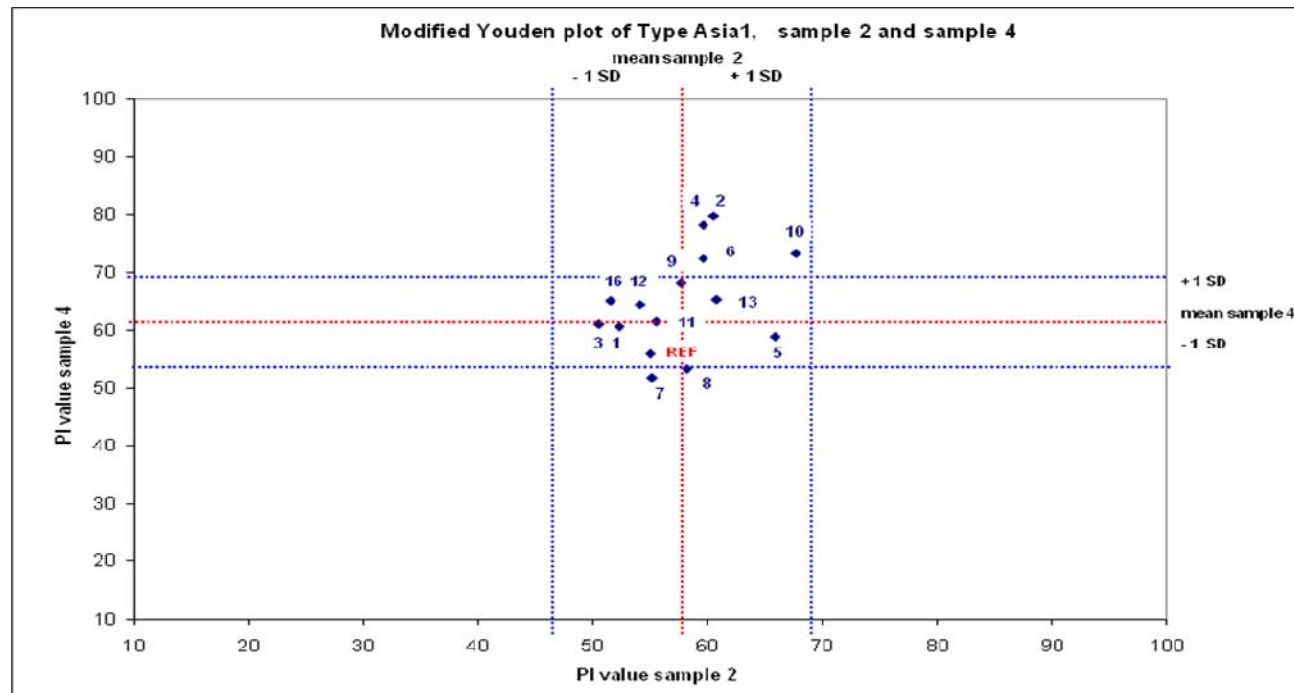
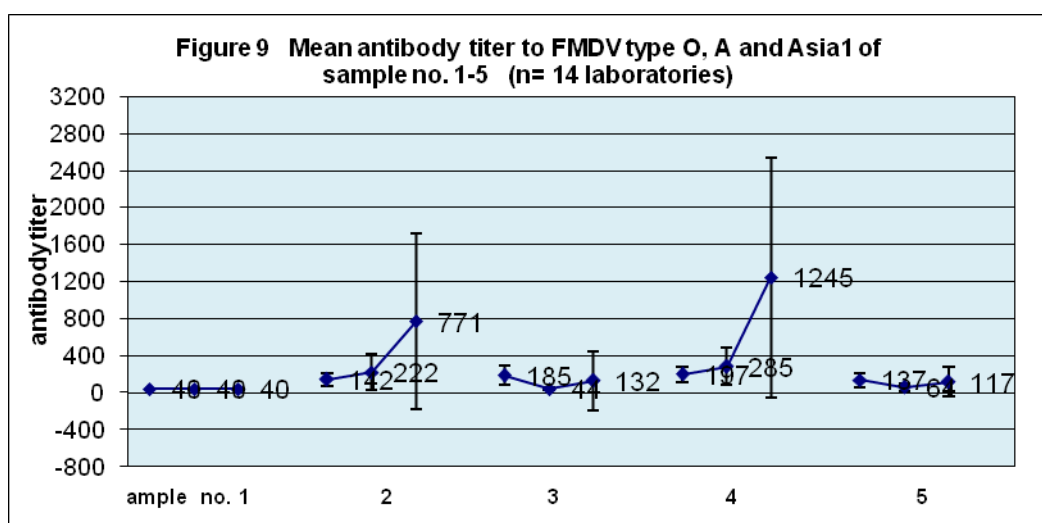


Figure 9. ตารางและแผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยแอนติบอดีไทเตอร์ต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ เอและเอเชียวัน ของแต่ละ Lab และค่าเฉลี่ยของ REF. Data ของ sample no. 1-5

Table 5 แสดงค่า NSP test และแอนติบอดีไทเตอร์เฉลี่ยของ Interlab serum no. 1-5 จากการเฉลี่ยค่าของ lab 1 ถึง lab 16 โดยเทียบกับค่า REF. Data

Interlab serum	Type O	Type A	Type Asia	3ABC	3B
Sample 1 ± 1SD	<40 ±0	<40 ±0	<40 ±0	-	ND
REF.data ± 1SD	<40±0	<40±0	<40±0	-	-
Sample 2 ± 1SD	143 ± 67	222±194	771 ±950	-	ND
REF.data ± 1SD	347±251	373 ±130	667 ±356	-	-
Sample 3 ± 1SD	15± 103	44 ±11	132 ±318	+	ND
REF.data ± 1SD	253±106	<40 ±0	46 ±16	+	+
Sample 4 ± 1SD	197± 88	285 ± 197	1245± 1294	-	ND
REF.data ± 1SD	293 ±65	480 ± 175	1760 ± 934	-	-
Sample 5 ± 1SD	137 ±73	64 ± 41	117 ± 161	-	ND
REF.data ± 1SD	133 ±41	67 ±20	67 ±48	-	-

ND = NOT DONE



ผลการตรวจ NSP test ปรากฏว่าทุกศูนย์ใช้ NS reagent Kit ของ 3ABC NS reagent kit (PrioCheck) Blocking ELISA เป็นหลัก ผลการทดสอบ NSP test ของทุกศูนย์ให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด คือ sample 3 ได้ผล positive เป็นซีรัมจากสัตว์ที่ได้รับการ challenge ด้วย FMDV type O ส่วน sample อื่นๆ เช่น sample 2, 4, 5 เป็นซีรัมจากสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน trivalent ส่วน sample 1 เป็น negative serum ในการทดสอบครั้งนี้ ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ได้มีการทดสอบ NSP test โดยใช้ 3B NSP (UBI) ได้ผลสอดคล้องกับผล 3 ABC NSP (PrioCheck) เช่นกัน ส่วน Lab อื่นๆ ไม่มีการใช้ 3B NSP (UBI) จึงไม่มีการแสดงผลในที่นี้

(ดูรายละเอียดผลการทดสอบ ELISA typing, LP ELISA, NSP ของแต่ละ Lab ได้ในภาคผนวก)

6. ข้อเสนอแนะและข้อสังเกตจากการจัดทำโครงการ Interlaboratory comparison testing

6.1 การจัดทำ Interlaboratory comparison programme ในปี 2011 นี้ พบว่ามีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการทั้งหมด 17 lab แต่มีการส่งผลการทดสอบและแบบสอบถามคืนให้กับผู้จัดทำหรือ provider เพียง 14 Lab ที่เหลือ 3 Lab นั้นพบว่ามีปัญหาด้านการทดสอบไม่ได้ผลและประกอบกับ reagent และ sample ถูกใช้หมดจึงไม่มีเหลือให้ทำการทดสอบซ้ำจึงไม่สามารถส่งผลได้ พบว่าบาง Lab ยังไม่เคยมีประสบการณ์ด้านการทดสอบทาง FMD serology จึงไม่คุ้นเคยกับการทดสอบวิธีนี้แม้ว่าจะมี SOP การทดสอบส่งให้ เป็นต้น ดังนั้นการวิเคราะห์ผลการทดสอบ Interlaboratory comparison ครั้งนี้ใช้ข้อมูลจากห้องปฏิบัติการเพียง 14 lab และทำการเทียบผลกับข้อมูลของ REF DATA ของหน่วยงานผู้จัด (provider)

6.2 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของทุกศูนย์มีความรู้ ความเข้าใจและประสบการณ์มากขึ้นกว่าเดิม เมื่อเทียบกับการทดสอบ Interlaboratory comparison เมื่อปี 2009-2010 มีเพียงส่วนน้อยที่ยังไม่มีความเข้าใจถึงความสำคัญของการตรวจสอบ บางครั้งพบว่าขาดความระมัดระวังในเทคนิคการตรวจสอบแต่ละขั้นตอนเช่น เทคนิคการทำ serum dilution หรือการเตรียมสารละลาย ยังไม่ตีเท่าที่ควร ทำให้ค่า OD ที่อ่านได้นั้นมีค่าไม่สม่ำเสมอ ทั้งนี้รวมถึงการใช้อุปกรณ์ micropipette ต่างๆ ที่ต้องใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยแต่ต้องมีความถูกต้องและความเที่ยงในปริมาตรที่ต้องการใช้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดข้อผิดพลาด ในขณะเดียวกันผู้ทดสอบต้องมีความละเอียดและความระมัดระวังในการใช้อุปกรณ์ micropipette ดังกล่าวและมันดูแลรักษาทำความสะอาดและทวนสอบตามระยะเวลาที่เหมาะสม

6.3 กรณีการทดสอบ LP ELISA การเตรียมสารละลายของ antigen control และ positive control serum ของ C++, C+ ของแต่ละไทป์ มีการเตรียม antigen control ใช้ความเข้มข้นสูงเกินตามที่กำหนด ส่งผลให้ค่า IQC ของ OD ของ antigen สูงเกินเกณฑ์กำหนดคือ OD ของ antigen ควรอยู่ในช่วง 0.9-1.5 ซึ่งเกิดขึ้นหลายศูนย์เช่น Lab 3, Lab 4, Lab12 และ Lab13 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ antigen ที่ใช้นั้นเป็นทั้ง concentrated และ purified antigen ทำให้ต้องมีการเจือจางค่อนข้างสูง หากศูนย์ใดไม่มีการทำ antigen titration ก่อนการทดสอบ ตัวอย่าง ย่อมส่งผลให้ค่า OD สูงเกินไป หรือบางครั้งปรับ dilution เองโดยไม่ได้ยึดหลักการ titration ที่ถูกต้อง

6.4 กรณีการทดสอบจำแนกชนิดไวรัสโดยวิธี ELISA typing test นั้นพบว่าบางศูนย์ได้ค่า OD ของ antigen control สูงเกินไปได้ค่ามากกว่า 2.00 แต่ยังสามารถอ่านผลได้สอดคล้องกับค่า REF DATA และยังคงพบ Lab 16 ได้ผลการทดสอบ ELISA typing เบี่ยงเบนไปจากความเป็นจริงคือได้ผล Negative ในตัวอย่างที่เป็น positive เป็นต้น เสนอแนะให้มีการทวนสอบย้อนกลับถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ไม่เป็นไปตามที่กำหนด

6.5 เสนอแนะให้มีการจัดทำกราฟประเมินและวิเคราะห์ผล Internal Quality Control Chart (IQC) ของการทดสอบ LP ELISA ของจำนวน 40 plate ทุกๆ 2 เดือน เพื่อดูแลแนวโน้ม control chart ยังอยู่หรือเริ่มออกนอกเกณฑ์กำหนดหรือควรมีการทวนสอบสารตรวจสอบโดยการ titrate สารอ้างอิงมาตรฐานเป็นระยะๆทุกๆ 2 เดือน ได้แก่ antigen titration, rabbit trapping antibody titration, guinea pig detecting antibody titration หรือ conjugate titration เพื่อหา working dilution ของสารเหล่านี้ ยังคงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจว่าห้องปฏิบัติการทดสอบของแต่ละศูนย์มีระบบประกันคุณภาพการทดสอบที่ดีและต้องตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอ

6.6 ห้องปฏิบัติการบางแห่งยังขาดความรู้ความเข้าใจในการปรับเปลี่ยน working dilution ของ สารตรวจสอบตามหลักวิชาการปรากฏว่ามีการปรับเปลี่ยนเองโดยไม่ได้มีการ re-titration สารตรวจสอบที่ต้องการปรับเปลี่ยนเพื่อให้ได้กลุ่ม control panel อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับหรือตามเกณฑ์กำหนด เช่นกรณีของ Lab 7 พบว่ามีการปรับ dilution ของ antigen control ทั้ง 3 ไทป์ในความเข้มข้นสูงมาก ทำให้มีปริมาณของ virus หลงเหลืออยู่มากในปฏิกิริยา blocking หรือ neutralizing ส่งผลให้ผลการทดสอบเบี่ยงเบนไปจากความเป็นจริง

เมื่อเทียบกับผลของ Lab อื่นๆ และค่า Reference data ซึ่งเห็นได้ชัดใน sample no. 32-35 อ่านผล antibody titer ที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริงมาก พบว่า type O ได้ผล negative หมดทุกตัวอย่าง ส่วน type A และ Asia1 นั้น titer ต่ำกว่าความเป็นจริงมาก ขอเสนอแนะให้มีการตรวจสอบสถานะของการเก็บรักษาสารตรวจสอบ คุณภาพ สารละลายบัฟเฟอร์หรือสารเคมีที่ใช้เตรียม ควรเลือกใช้สารที่มีความบริสุทธิ์สูงควรบ่งชี้ catalogue no. และ ยี่ห้อ สารเคมี ไม่แนะนำให้เปลี่ยนใช้ยี่ห้อบ่อยๆ รวมถึงการทำความเข้าใจในกระบวนการทดสอบและปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดผลการทดสอบที่ไม่เป็นไปตามที่กำหนด

7. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำโครงการขอขอบคุณ Dr. Ronello Abila, OIE-SRR และ OIE-RCU ในการสนับสนุนงบประมาณในการจัดประชุมสัมมนาเชิงวิชาการ SEACFMD Laboratories Network Meeting ครั้งที่ 6 และ งบประมาณ ค่าใช้จ่ายในการเตรียม reagent , unknown sample ให้กับห้องปฏิบัติการภายในโครงการ SEACFMD Control Campaign ในครั้งนี้ ขอขอบคุณอธิบดีกรมปศุสัตว์ ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เจ้าหน้าที่ทุกท่านจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ทั้ง 7 ศูนย์และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เจ้าหน้าที่ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในการจัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์และสารตรวจสอบในโครงการ Interlaboratory comparison programme ให้สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพและบรรลุเป้าหมายตามวัตถุประสงค์ของโครงการและขอขอบคุณ SEACFMD National Laboratory ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ให้ความร่วมมือเข้าร่วมโครงการดังกล่าว จนบรรลุผลสำเร็จ

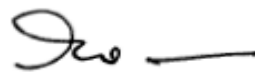
8. เอกสารอ้างอิง

Axel Colling (1998). The External Quality Assurance Programme for use with the FAO/IAEA FMD LPB-Antibody ELISA, Animal production and Health Section. FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Seiberdorf, Austria

9. คณะทำงานจัดเตรียมตัวอย่างและสารตรวจสอบ

รายชื่อคณะทำงานในการจัดทำโครงการเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการด้านการตรวจจำแนก ชนิดไวรัส โดยวิธี ELISA typing การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยวิธี LP ELISA, และ non structure protein test (NSPs) มีดังนี้

- นางสาววิไล ลินจงสุขงกช
- นายดิลก อ้วนพรมมา
- นางกิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย
- นางสาวปิยภรณ์ เจริญผล
- นางสาวโสภา สิงคลีบุตร
- นางสาวจรรยา สมานิตย์
- นางรัตนี ทองทา



(สัตวแพทย์หญิงวิไล ลินจงสุขงกชและคณะ)

ผู้รายงานสรุปผลและวิเคราะห์ผล

ภาคผนวก

1. แสดงข้อมูลดิบและค่า OD ของการทดสอบ ELISA typing ของแต่ละห้องปฏิบัติการทั้งภายในและต่างประเทศของ Lab 1 - Lab 16 และ Reference data
(ในการทดสอบครั้งนี้ ไม่มีการวิเคราะห์ข้อมูลของ Lab 14, Lab15 และ Lab 17 เนื่องจากไม่ได้ส่งผลการทดสอบให้ provider)

2. แสดงข้อมูลดิบและค่า OD ของการทดสอบ LP ELISA ของแต่ละห้องปฏิบัติการทั้งภายในและต่างประเทศของ Lab 1 - Lab 16 และ Reference data
(ในการทดสอบครั้งนี้ ไม่มีการวิเคราะห์ข้อมูลของ Lab 14, Lab15 และ Lab 17 เนื่องจากไม่ได้ส่งผลการทดสอบให้ provider)