<u>แบบประเมินสำหรับ Molecular Diagnostic Test for Monkeypox</u>

หัวข้อ เอกสารสรุปการทวนสอบและการตรวจสอบความถูกต้องของการออกแบบ (Validation & Verification) ของชุดตรวจ Molecular ที่เป็น Novel product (สิ่งใหม่ นวัตกรรมใหม่หรือผลิตภัณฑ์สำหรับเชื้ออุบัติการณ์ใหม่) ต้องมีการประเมินเอกสารเทคโนโลยีของชุดตรวจอย่างละเอียด รวมถึงการส่งประเมินโดยผู้เชี่ยวชาญ ดังนั้น ให้ท่านแก้ไขข้อบกพร่องในประเด็นตามที่ระบุให้เรียบร้อย (ไฮไลท์สีเหลืองให้เพื่อความชัดเจน) หากไม่สามารถเพิ่มเติมข้อมูลประสิทธิภาพและความปลอดภัยได้เพียงพอ จะไม่สามารถขึ้นทะเบียนได้และถูกคืนคำขอ

<u>หมายเหตุ</u> หากมีการเปลี่ยนแปลงตามนโยบายการควบคุมโรคระบาดของประเทศ จะมีการปรับแนวทางการกำกับดูแลชุดตรวจตามความเหมาะสม

☑ Applicable =มีเอกสาร

☑ Not Applicable =ไม่พบ/ไม่มีเอกสาร

☑ Corrective = มีเอกสาร แต่พบข้อบกพร่องบางส่วน

ข้อสรุปการประเมิน (Evaluation Conclusion)	
หัวข้อ (Topics)	**ผลการประเมิน (Evaluation Results)**
การออกแบบผลิตภัณฑ์ (Product Design)	
1. ภาพรวมการออกแบบ (Design overview) - ต้องแสดงข้อมูลถึงการออกแบบและลักษณะของชุดตรวจ (Flowchart design process) รวมถึง design inputs และ outputs	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
2. การกำหนดสูตรส่วนประกอบ (Composition) - ต้องแสดงรายละเอียดและสูตรส่วนประกอบของวัตถุดิบรวมถึงปริมาณและความเข้มข้น (ingredients formulation, composition information, relevant concentrations) ของส่วนประกอบสำคัญ	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
- ต้องแสดงข้อมูล sequences primers และ probes	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
- ต้องแสดงข้อมูล internal control (IC) ซึ่งอาจเป็นแบบต่าง ๆ เช่น แบบ exogenous แบบ endogenous หรือ spike โดยระบุจุดประสงค์การทำงานของแต่ละสิ่งโดยอย่างน้อยต้องสามารถควบคุมคุณภาพขั้นตอนการสกัดและการยับยั้งปฏิกิริยาได้	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
3. ความปลอดภัยและความอันตรายทางชีวภาพ (Biosafety & Biohazard) - ต้องแสดงเอกสารหรือหลักฐานว่าการใช้ผลิตภัณฑ์อย่างถูกวิธีจะมีความปลอดภัย วิธีการใช้ การทิ้งหรือกำจัดที่เหมาะสมและไม่เกิดอันตรายต่อผู้ใช้งาน	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
ข้อมูลด้านประสิทธิภาพและเอกสารสรุปการทวนสอบและการตรวจสอบความถูกต้องของการออกแบบ (Product performance specification and associated validation and verification studies)	

Analytical performance	
1. การศึกษา matrix equivalence <u>หมายเหตุ</u> กรณีชุดตรวจสามารถตรวจได้กับสิ่งส่งตรวจหลายชนิด หากผู้ผลิตสามารถแสดงความเทียบเท่ากันของสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดได้ จะสามารถใช้สิ่งส่งตรวจชนิดเดียวเป็นตัวแทนในการศึกษาในหัวข้อดังต่อไปนี้ Precision, Analytical specificity, Robustness, Stability	
1.1 การศึกษา Matrix equivalency **<u>กับสิ่งส่งตรวจต่างชนิด</u>** 1.2 การศึกษา Matrix equivalency **<u>กับสิ่งส่งตรวจที่ใช้กับอุปกรณ์ต่างชนิด</u>** เช่นต่าง swab หรือ ต่าง transport media - ต้องมีจำนวนอย่างน้อย 4 ตัวอย่างบวก ซึ่งประกอบด้วย 1 ตัวอย่างบวกต่ำ (เช่น 2-3 เท่าของ LoD หรือ cut-off) และ 3 ตัวอย่างบวกปานกลาง (เช่น 5-7 เท่าของ LoD หรือ cut-off) - ต้องมีจำนวนอย่างน้อย 1 ตัวอย่างลบ ในแต่ละชนิดของตัวอย่าง - ต้องทดสอบทั้ง 5 ตัวอย่างแบบ duplicate และเปรียบเทียบผลกับ matrix ต่าง ๆ - ชุดตรวจที่อ่านผลด้วยตาต้องมีการสุ่มหรือสลับตัวอย่างในขั้นตอนการอ่านผล (Blinding and randomization of the specimens)	☐Applicable และข้อมูลการศึกษาสอดคล้องกับชนิดตัวอย่างตามข้อบ่งใช้ ☐ Not Applicable ☐ Corrective
2. การสอบกลับได้ (Metrological traceability) ของค่าของ calibrator และ control (หากมี reference material)	
- น้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ต้องสอบเทียบกับสารมาตรฐานสากล (calibrated against International Standard)	☐Applicable ☐ Not Applicable ☐ Corrective
- ต้องมีรายละเอียดจากผู้ผลิต เช่น DNA pseudotyped viruses ซึ่งต้องรวมถึงข้อมูล GenBank accession number ที่เป็น Sequence เป้าหมายและต้องสัมพันธ์กับ International Standard - ต้องมีเอกสารที่เกี่ยวกับ Cell culture virus จากผู้ผลิตซึ่งมีรายละเอียดถึงแหล่งที่มา passage history และปริมาณ (PFU/mL or TCID50/mL)	☐Applicable ☐ Not Applicable ☐ Corrective
3. Precision ประกอบด้วย Repeatability และ Reproducibility	
3.1 Repeatability - ต้องมีรายละเอียดการศึกษาและมีการแสดงข้อมูลการศึกษารูปแบบต่าง ๆ เช่น การทำ within-run	
3.2 Reproducibility (intermediate precision) - ต้องมีรายละเอียดการศึกษาและมีการแสดงข้อมูลการศึกษารูปแบบต่าง ๆ เช่น between-days, between-runs, between-sites, between-lots, between-operators, between- instruments	
- รายละเอียด**ข้อ 3.1 และ 3.2** ต้องมีตัวอย่างลบอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างบวกต่ำ 1 ตัวอย่าง (เช่น 2-3 เท่าของ LoD หรือ cut-off) และตัวอย่างบวกปานกลาง 1 ตัวอย่าง (เช่น 5-7 เท่าของ LoD หรือ cut-off) - เกณฑ์ที่ตั้งไว้ควรรวมถึงค่าสูงสุดที่ Ct สามารถแกว่งได้โดยไม่มีผลต่อประสิทธิภาพ	☐Applicable ☐ Not Applicable ☐ Corrective

ซึ่ง %CV ต้องไม่เกิน 5%	
4. Analytical sensitivity (limit of detection = LoD)	
- ต้องมีการศึกษาหาค่า LoD แยกตามชนิดตัวอย่างที่ใช้ทุกชนิด (ไม่ได้รับข้อยกเว้นแม้มีการทำ matrix equivalency แล้วก็ตาม)	☐ Applicable และข้อมูลการศึกษาสอดคล้องกับชนิดตัวอย่างตามข้อบ่งใช้ ☐ Not Applicable ☐ Corrective
- เมื่อเชื้อมีการกลายพันธุ์หรือมีสายพันธุ์ที่น่ากังวล (Variant of concern = VOCs) ต้องหาผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับ Analytical sensitivity	☐ Applicable ☐ Not Applicable ☐ Corrective
- การศึกษา Analytical sensitivity ต้องทดสอบโดยใช้น้ำยาและวัสดุอุปกรณ์ทั้งหมดตามที่ผลิตภัณฑ์ถูกออกแบบมา เริ่มตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง การสกัด การทดสอบ - ผู้ผลิตต้องศึกษาหา Analytical sensitivity โดยใช้สารมาตรฐานสากล - ค่า LoD แบบเบื้องต้นสามารถหาได้จากการเจือจาง (dilution) จากตัวอย่างที่ถูก spike จากนั้นดำเนินการสกัด และทดสอบหาค่าจำนวน 3-5 replicates - เมื่อทราบค่า LoD แบบเบื้องต้นแล้ว ต้องยืนยันค่าดังกล่าวด้วยการทดสอบอีก 20 replicates เพื่อเป็นการยืนยันค่า LoD โดยค่า LoD จะเป็นค่าที่สามารถตรวจพบได้อย่างน้อย 95% (19 จาก 20 replicates) - หากทดสอบแล้วสามารถตรวจพบได้ 100% ให้ลดความเข้มข้น (dilution) จนกว่าจะสามารถตรวจพบได้น้อยกว่า 100% - ต้องมีข้อมูลสายพันธุ์จากระบบฐานข้อมูลสากล เช่น NCBI GenBank หรือ GISAID ของเชื้อที่ใช้ทดสอบ LoD และต้องมีข้อมูลของกระบวนการเตรียมเชื้อและการทำ dilution titer ต่าง ๆ - ต้องมีข้อมูล dilution factor และจำนวนการทำ serial dilutions ของเชื้อที่ใช้ทดสอบ LoD - ต้องแสดงข้อมูลวิธีการสกัด เครื่องสกัด (หากมี) ปริมาณที่สกัด (Elution volume) เครื่อง PCR และสภาวะที่ทดสอบ (cycling conditions)	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
5. Analytical specificity	
5.1 Interfering substances	
- ต้องมีการทดสอบสารที่อาจรบกวนปฏิกิริยา (potential interfering substances) โดยผลทดสอบต้องแสดงว่า สารที่อาจรบกวนปฏิกิริยาไม่ทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ในตัวอย่างลบ (known negative specimens) และต้องไม่ทำให้เกิดผลลบปลอม (false negative) ในตัวอย่างบวก (known positive specimens)	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
- ต้องแสดงรายการ interfering substances และความเข้มข้นที่ใช้ - ต้องมี Endogenous และ exogenous substances ที่ spike ลงในตัวอย่าง negative ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถพบได้ - ต้องมี Endogenous และ exogenous substances ทดสอบกับทั้ง unspike และ spike ที่ความเข้มข้นต่ำที่เหมาะสม (เช่นประมาณ 2-3 เท่าของ LoD หรือ cut-off)	☐ Applicable และมีการทดสอบกับสารครอบคลุม interfering substances จากสารที่มีโอกาสพบจากตัวอย่างที่ใช้ตัวอย่างจากตาราง ☐ Not Applicable ☐ Corrective

- ตัวอย่างต้องทดสอบ 3 ซ้ำ (triplicate) โดยการทดสอบสามารถทำเพียงตัวอย่างชนิดเดียว (และจาก matrix เดียว) จากที่ชุดตรวจได้กำหนดให้ใช้กับตัวอย่างและ matrix ไว้หลายชนิด
- ต้องทดสอบ interfering substances จากสารที่มีโอกาสพบจากตัวอย่างที่ใช้ตัวอย่างเช่น e.g.

Potential interfering substances **Specimen : skin lesion, pusicle, rash**
Heme
Lactoferrin
Immunoglobulin G
Melanin
Skin lotion
Anti-viral drugs
Anti-microbial drugs
Immunosuppressant drugs
Chemotherapeutics drugs

ตัวอย่างสารที่อาจรบกวนอ้างจาก

1 . Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR Johannes Hedman and Peter Rådström จาก https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23104280/

2. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal จาก https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22747964/

3. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR จาก https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x

5.2 Cross reactivity

5.2.1 Laboratory testing

- **<u>ต้องมีการทดสอบ</u>**กับเชื้อหรือสายพันธุ์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับเชื้อที่ต้องการหา รวมถึงเชื้อที่ทำให้มีอาการแสดงใกล้เคียงกับเชื้อที่ต้องการหา และต้องมีเชื้อที่มีโอกาสพบได้จากตัวอย่างที่เก็บ (normal or pathogenic microflora)

เชื้อกลุ่มเดียวกัน/เชื้อที่ทำให้เกิดอาการคล้ายกัน/เชื้อที่มักพบในสิ่งส่งตรวจเดียวกัน
Vaccinia virus
Variola virus
Camelpox virus
Teterapox virus
Raccoonpox virus
Cowpox virus
Varicella-zoster virus
HSV-1, HSV-2 virus

☐ Applicable และมีการทดสอบกับสารครอบคลุมเชื้อกลุ่มเดียวกัน/เชื้อที่ทำให้เกิดอาการคล้ายกัน/เชื้อที่มักพบในสิ่งส่งตรวจเดียวกัน
ตัวอย่างจากตาราง
☐ Not Applicable ☐ Corrective

Measles virus Rubella virus Treponema pallidum* Candida albicans * Staphylococcus aureus* Staphylococcus epidermis* Enterobacter* Proteus spp.* Escherichia coli* Klebsiella spp.* Acinetobacter spp.* *กรณีไม่มีการทดสอบจริงต้องมีข้อมูลด้าน Bioinformatics ตัวอย่างเชื้อที่อาจรบกวนอ้างจาก 1. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA จาก https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012. 2. Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 6Normal Flora จาก https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/#A512 3. Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region จาก https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17332145/	
- ในการทดสอบ กรณีแบคทีเรียต้องมีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^6 CFU/ml ขึ้นไป และกรณีไวรัสต้องมีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^5 PFU/ml ขึ้นไป ตัวอย่างที่ใช้สามารถเตรียมได้จากการ spike เชื้อลงในตัวอย่างลบ - ตัวอย่างต้องทดสอบ 3 ซ้ำ (triplicate) โดยการทดสอบสามารถทำเพียงตัวอย่างชนิดเดียว จากที่ชุดตรวจได้กำหนดให้ใช้กับตัวอย่างไว้หลายชนิด	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
5.2.2 In silico analysis - การใช้ข้อมูล Bioinformatics จำลองและประมวลผลในคอมพิวเตอร์	
- การวิเคราะห์ข้อมูลต้องทำจากเชื้อตัวแทนแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูล GenBank sequence database - ต้องวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดของ sequence - หากผลวิเคราะห์ in silico พบโอกาสที่จะทำให้เกิด Cross-reactivity เช่น primer หรือ probe มีความเหมือนกัน ≥ 80% ให้พิจารณาการเรียงตัวและวิเคราะห์ตำแหน่งที่เหมือนและต่าง และจำเป็นต้องมีการทดสอบจริงเพื่อตรวจสอบว่ามีผลกระทบต่อประสิทธิภาพหรือไม่ - **<u>ในกรณีนี้ที่ไม่ทดสอบจริง</u>** ต้องมีข้อมูลสนับสนุนว่าข้อมูลที่ได้จาก in-silico ไม่มีความเกี่ยวข้องทางคลินิก (irrelevant isolate, location/extent of match within primer/probe) หรืออธิบายเหตุผลที่ทำให้ไม่กระทบต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจ เชื้อที่ทำให้เกิดอาการคล้ายกัน/เชื้อที่มักพบในสิ่งส่งตรวจเดียวกัน	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective

Treponema pallidum Candida albicans Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermis Enterobacter Proteus spp. Escherichia coli Klebsiella spp. Acinetobacter spp. ตัวอย่างเชื้อที่อาจรบกวนอ้างจาก 1. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA จาก https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012. 2. Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 6Normal Flora จาก https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/#A512 3. Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region จาก https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17332145/	
5.3 Microbial Interference Microbial interference studies aim at demonstrating that false negatives for MPXV will not occur in presence of other microorganisms.	
- **หากผลการวิเคราะห์ In silico พบความเหมือนกัน/ความเข้ากันได้ของ probe /primer ต่อเชื้อใดๆ ≥ 80%** (≥ 80% homology) เชื้อนั้นอาจรบกวนต่อปฏิกิริยาในขั้นตอนการสกัดได้ (แม้จะมีผลว่าไม่เกิด cross-reactivity ก็ตาม) **ให้พิจารณาการทดสอบดังต่อไปนี้** **5.3.1** การทดสอบ microbial interference ที่เกิดจาก co-infection ของ Monkeypox virus กับเชื้อที่ primer และ probe มีความจำเพาะ **5.3.2** (ทางเลือกอื่นสำหรับการศึกษา microbial interference) ให้ใช้การแสดงเหตุผลและข้อมูลต่างๆ เช่น ชนิด/ปริมาณของ primer หรือ probe ใน master mix เพื่อเป็นการแสดงว่า co-infection หรือสารที่เกิดจาก co-infection ดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจ **5.3.3** แสดงคำอธิบายว่าผล in-silico ดังกล่าวไม่มีความเกี่ยวข้องทางคลินิก	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
- การศึกษา microbial interference ต้องทดสอบโดยการใช้ตัวอย่าง spike ที่ความเข้มข้นต่ำ (2-3 เท่าของ LoD) และสารรบกวนที่มีปริมาณมาก (เชื้ออื่น หรือ nucleic acids) เพื่อทดสอบเหตุการณ์ที่แย่ที่สุด โดยต้องทำอย่างน้อย 3 replicate - หากพบการรบกวนปฏิกิริยา ต้องทำการทดสอบต่อโดยการทำ titration study เพื่อหาปริมาณเชื้อรบกวนที่มากที่สุดที่ชุดตรวจสามารถทดสอบได้	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
6. Validation of the primer and probe choice	
ต้องมีหลักฐานทางวิชาการสนับสนุนเกี่ยวกับ primer และ probe ที่เลือกใช้ ซึ่งต้องมี	☐Applicable ☐Not Applicable

ข้อมูลดังต่อไปนี้ - target gene และ sequence ของ primer และ probe - เหตุผลที่เลือก primer probe และ sequence ดังกล่าว - ประโยชน์ที่เลือกให้เกิดการจับที่ sequence ดังกล่าว เช่น maximum homology to several strains	☐ Corrective
- ต้องมีการประเมินผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นเมื่อมีการกลายพันธุ์โดยเฉพาะ mutation หรือ deletions ที่เกี่ยวกับสายพันธุ์ที่เป็นที่น่ากังวล (variants of concern (VOC))	☐Applicable ☐ Not Applicable ☐ Corrective
7. Validation of assay procedure	
Procedural control - หากมีการใช้ internal control แบบ endogenous (housekeeping gene) **ต้องมีการระบุช่วงค่า Ct ที่เหมาะสมในตัวอย่างที่ใช้แต่ละชนิด** - หากมีการใช้ internal control แบบ exogenous **ต้องมีการระบุช่วงค่า Ct ที่เหมาะสม**	☐Applicable ☐ Not Applicable ☐ Corrective
8. Flex และ robustness	
เป็นการศึกษาว่าชุดตรวจสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมต่างๆที่มีความหลากหลายหรือการใช้งานที่ไม่เหมาะสม ทำให้มั่นใจได้ว่าการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมเหล่านั้นไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพ (Function correctly under varying conditions of improper use, ensuring that slight variations in the test do not affect results)	
มีการทดสอบในหัวข้อ - ปริมาณสิ่งส่งตรวจและน้ำยา - อุณหภูมิที่ทดสอบ	☐Applicable ☐ Not Applicable ☐ Corrective
9.Stability	
เป็นการทดสอบความคงตัวของน้ำยาในรูปแบบต่างๆ ซึ่งต้องทดสอบเพื่อประเมินอายุการใช้งานของน้ำยาครบทุกส่วนประกอบ (หากไม่ครบทุกส่วนประกอบ ต้องมีเหตุผลสนับสนุน) โดยข้อมูลการศึกษาในหัวข้อ Shelf-life, in-use stability และ shipping stability ต้องมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิการเก็บรักษาและการใช้งานตาที่ปรากฏใน IFU และฉลาก	
9.1 อายุการเก็บรักษา (Shelf-life) จากการทดสอบ ความคงตัวจากสภาวะจริง (Real-time stability) และ/หรือ ความคงตัวจากสภาวะเร่ง (Accelerated stability)	
- การทดสอบ Real time stability เพื่อทำให้ทราบว่าชุดตรวจและส่วนประกอบต่างๆทั้งหมดสามารถเก็บได้นานเพียงใด - ทดสอบในอุณหภูมิจุดที่ต่ำที่สุดและมากที่สุดที่ชุดตรวจสามารถเก็บรักษาได้ - ควรทดสอบกับตัวอย่างลบอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างบวกต่ำอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง โดยต้องแสดงค่า Ct ในแต่ละการทดสอบและแต่ละ replicate ควบคู่กับอุณหภูมิและเวลาจุดต่างๆที่ทดสอบ	☐Applicable ☐ Not Applicable ☐ Corrective

- หากการทดสอบ Real time stability ยังดำเนินการได้ไม่นานพอที่จะกำหนด shelf life สามารถใช้ผลการทดสอบ Accelerated stability ประกอบกับการคำนวณเพื่อคาดการณ์ shelf life เบื้องต้นล่วงหน้าได้ แต่อย่างไรก็ตามอายุการใช้งานจริงจะถูกกำหนดจากผลการทดสอบ Real time stability - หากการศึกษาใดที่ยังไม่เสร็จสิ้น ต้องมีการวางแผนการศึกษา และมีการระบุวันที่เสร็จสิ้นชัดเจน	
9.2 ความคงตัวขณะขนส่ง (shipping stability)	
โดยน้ำยาต้องทดสอบในสภาภาวะขนส่งจริงหรือใช้การจำลองก่อนการศึกษาหา shelf-life ควรทดสอบในสภาวะที่สะท้อนถึงสภาพแวดล้อมจริงในประเทศนั้น ในประเด็นดังต่อไปนี้ - ทดสอบในสภาวะที่เลียนแบบสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นด้านอุณหภูมิ ความชื้น แรงดัน ในระหว่างการขนส่ง - จุดที่ต่ำที่สุดและมากที่สุดทั้งอุณหภูมิและความชื้นที่ชุดตรวจสามารถเก็บรักษาได้ - หากการศึกษาใดที่ยังไม่เสร็จสิ้น ต้องมีการวางแผนการศึกษา และมีการระบุวันที่เสร็จสิ้นชัดเจน - ควรทดสอบกับตัวอย่างลบอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างบวกต่ำอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง โดยต้องแสดงค่า Ct ในแต่ละการทดสอบและแต่ละ replicate ควบคู่กับสภาพแวดล้อมอุณหภูมิและเวลาจุดต่างๆที่ทดสอบ	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
9.3 ความคงตัวในการใช้งาน (In-use stability)	
- ต้องแสดงผลการศึกษา in-use stability ที่ทดสอบกับชุดตรวจที่เปิดใช้แล้ว (open pack or open vial stability) - ส่วนประกอบที่สามารถเสื่อมสภาพได้ทั้งหมดต้องรวมอยู่ในการศึกษา เช่น buffers vials, sealed cartridges, control materials - ต้องมีการทดสอบความคงตัวในการใช้งานกับเครื่อง (On-board stability) เมื่อใช้คู่กับเครื่อง - ต้องมีการพิจารณาถึง อุณหภูมิที่ใช้งานน้ำยา (operating temperature) ช่วงความชื้น (Humidity range) จำนวนครั้งที่สามารถ freeze-thaw ได้ของน้ำยาและ control ต่างๆ	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
ข้อมูลการศึกษาในหัวข้อ Shelf-life, in-use stability และ shipping stability ต้องมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิการเก็บรักษาและการใช้งานตามที่ปรากฏใน IFU และฉลาก	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
10. Specimen stability (ความคงตัวของสิ่งส่งตรวจ)	
- ต้องมีการศึกษาความคงตัวของการเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย (collection) การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจ (storage) และการขนส่ง (transport)	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
- ต้องระบุชนิดของสิ่งส่งตรวจที่สามารถใช้ทดสอบได้ ซึ่งต้องเป็นสิ่งส่งตรวจชนิดที่สอดคล้องกับแนวทางการวินิจฉัยระดับสากล เช่น CDC กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective

- ต้องมีข้อมูลการศึกษาความคงตัวครบทุกชนิดของสิ่งส่งตรวจที่ใช้	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
- หากในการศึกษามีการใช้สิ่งส่งตรวจที่มีการแช่แข็ง (frozen specimens) ต้องมีการทดสอบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บใหม่	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective

Clinical performance	
- ตัวอย่างหรือประชากรทั้งหมดที่ได้กล่าวอ้างการศึกษาไว้ในเอกสารกำกับต้องมีการศึกษาทั้งหมด - หากมีการกล่าวอ้างถึงกลุ่มที่ไม่มีอาการ (asymptomatic) ประชากรกลุ่มนี้ต้องรวมอยู่ในการศึกษาด้วย - การทดสอบต้องทำโดยผู้ใช้งาน (intended user) ตามข้อบ่งใช้ - การศึกษาต้องทำการทดสอบแยกในแต่ละชนิดของตัวอย่าง (หากมีการขอเพิ่มชนิดตัวอย่างที่ใช้ภายหลังต้องมีการศึกษาด้วย) - หากกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อยอาจทำให้ผลการศึกษาเกิด Bias ได้ ต้องมีการอธิบายถึงเกณฑ์ที่ใช้เลือกกลุ่มตัวอย่าง นอกจากนี้หากเป็นการทดสอบจากตัวอย่างที่เก็บไว้ (retrospective testing) ควรทดสอบแบบสุ่มไม่ทราบค่า (blind)	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
1. Comparator method	
- การทำ comparator method ควรเปรียบเทียบโดยการเทียบกับชุดตรวจหลักการ PCR ที่ Sensitivity สูงและใช้การสกัดสารพันธุกรรม ด้วยวิธี chemical lysis ตามด้วย solid-phase extraction เช่น วิธี magnetic bead extraction - Comparator assay ต้องไม่มี primer หรือ probe (sequence) เดียวกัน (primer หรือ probe ที่ใช้ต้องแตกต่างจาก comparator assay) - ต้องมีค่า Ct ของชุดตรวจที่กำลังศึกษาและของชุดตรวจที่นำมาเปรียบเทียบ	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective
2. Clinical sensitivity/ diagnostic sensitivity	

ชนิดตัวอย่าง (Specimen type)	**จำนวนตัวอย่างบวก (No. of positive specimens from individual patients to be tested for a symptomatic claim)**	**ชนิดตัวอย่างของวิธีอ้างอิง (Specimen type for the reference test)**	**หมายเหตุ**
Vesicular swabs หรือ Pustular fluid	100	Vesicular swabs หรือ Pustular fluid	เป็นชนิดตัวอย่างที่แนะนำในการวินิจฉัย MPXV จาก WHO
Swab of lesion exudate หรือ lesion	100	Swab of lesion exudate หรือ lesion crust/scrape	เป็นชนิดตัวอย่างที่แนะนำในการวินิจฉัย MPXV จาก WHO

crust/scrape			
Non-lesion specimen อื่นๆ	100	ชนิดตัวอย่างที่เป็นไปตามแนวทางการตรวจวินิจฉัยจาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, WHO, USFDA หรือ CDC (ได้แก่ Vesicular swabs, Pustular fluid, Swab of lesion exudate, lesion crust/ scrape)	เชื้ออาจมีปริมาณน้อย, ให้เป็นไปตามแนวทางการตรวจวินิจฉัยจาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, WHO, USFDA หรือ CDC

ตัวอย่างมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับการคำนวณ Sample size อ้างจาก EN 13975 : 2003, CLSI EP09-A3, EP15-A3 หรือ EP24-A2

ในตัวอย่าง (specimen) แต่ละชนิดต้องมีข้อมูลดังนี้ - ชนิดของตัวอย่าง (specimen type) - วันที่เก็บตัวอย่าง (specimen collection date) - วันที่แสดงอาการ (Date of onset of symptoms) - การวินิจฉัยทางคลินิก (ถ้ามี) (Clinical diagnosis (if available)) - ความรุนแรงของอาการ (ถ้ามี) (Severity of symptoms (if known)) - การทดสอบที่ใช้บอกว่าเป็น Monkeypox (Tests used to identify Monkeypox patients) - ข้อมูล Ct และ Internal control ของผลการทดสอบ PCR (Ct values of Monkeypox targets and internal control)	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective ☐ในการทดสอบพบว่าไม่ได้ใช้ตัวอย่าง Clinical sample จริง ☐ไม่มีรายละเอียดของวิธีการทดสอบที่ได้นำมาเปรียบเทียบ (reference method? Comparator method?) ☐ไม่ได้ระบุชนิดสิ่งส่งตรวจที่ใช้ทดสอบตามที่กำหนดให้ใช้ใน Intended use
3. Clinical / diagnostic specificity	
ต้องมีตัวอย่างลบต่อ Monkeypox virus อย่างน้อย 100 ตัวอย่างโดยตัวอย่างดังกล่าวต้องเป็นผู้ป่วยที่มีอาการอยู่ในกลุ่มต้องสงสัยต่อ Monkeypox virus	☐Applicable ☐Not Applicable ☐ Corrective

อ้างอิงมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง

1. CLSI MM17 Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays
2. CLSI MM13 Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods
3. CLSI MM03 Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases
4. CLSI EP35 Assessment of Equivalence or Suitability of Specimen Types for Medical Laboratory Measurement Procedures
5. CLSI EP32-R Metrological Traceability and Its Implementation; A Report
6. CLSI EP25-A Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline
7. CLSI EP15-A3 User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition
8. CLSI EP12-A2 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—Second Edition
9. CLSI EP09c Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples
10. CLSI EP06 Evaluation of Linearity of Quantitative Measurement Procedures
11. CLSI EP05-A3 Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition
12. CLSI EP17-A2 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition