

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบคุณภาพและความคงสภาพของพลาสมาคนปกติ สำหรับการทดสอบการแข็งตัวของเลือด

ผกายมาศ ปิณฑะดิษ, สุกัญญา โชตศุภการย์, อุมพร อุดมทรัพย์ากุล, วีระศักดิ์ ศาสนกุล
และ อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์*

สำนักงานวิจัยคณะฯ, *ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

บทคัดย่อ: ได้ทำการศึกษาคุณภาพและความคงสภาพของ normal pooled plasma (NP) โดยใช้การทดสอบ activated partial thromboplastin time (APTT) และการตรวจ factor VIII clotting activity (FVIII: C) เป็นเครื่องชี้วัด NP นี้เตรียมจากเลือดคนปกติชาย 5 คน หญิง 5 คน ที่มีค่า coagulogram ปกติ เก็บพลาสมาไว้ที่ตู้แช่แข็ง -15°C , -30°C และ -70°C โดยวิธีแช่แข็งธรรมดาและวิธีแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (snap freeze) ที่เวลา 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ นำตัวอย่างมาทดสอบ APTT และ FVIII:C ผลการศึกษา APTT พบว่า NP ที่เก็บ -15°C , -30°C และ -70°C โดยแช่แข็งธรรมดาเก็บนาน 12 สัปดาห์มีความเปลี่ยนแปลง (%CV) เท่ากับ 14.2, 5.0, 4.2 ตามลำดับและโดยวิธี snap freeze ได้ค่า %CV 11.4, 6.6, 3.3 ตามลำดับ ผลของ FVIII:C พบว่าที่เก็บ -15°C , -30°C และ -70°C โดยแช่แข็งธรรมดาและวิธี snap freeze เก็บนาน 12 สัปดาห์มี %CV มากกว่า 10% สรุปได้ว่า NP ที่เตรียมเองเมื่อนำมาใช้เป็น normal control สำหรับ APTT ถ้าเก็บที่ -30°C และ -70°C ยังใช้ได้ดีเพราะมี %CV น้อยกว่า 10 ทั้งที่เก็บโดยแช่แข็งธรรมดาและวิธี snap freeze แต่นำไปใช้เป็น standard plasma ในการทำ FVIII:C activity ไม่ได้ เนื่องจากค่า %CV มากกว่า 10

Key Words : ● Normal pooled plasma ● Activated partial thromboplastin time ● Factor VIII
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2544;11:149-53.

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับปัจจัยการแข็งตัวของเลือด จำเป็นต้องมี standard plasma หรือ calibration plasma ซึ่งเป็นพลาสมาปกติ และใช้สำหรับ

การสร้าง standard curve ในการวัดระดับ FVIII:C และแฟกเตอร์อื่นๆ รวมทั้งการตรวจ screening coagulogram ได้แก่ prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (PTT), thrombin time (TT) ก็จำเป็นต้องมีพลาสมาปกติ เป็น normal control เพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของน้ำยา เครื่องมือ และวิธีการทำในแต่ละครั้ง ทั้งนี้เพื่อให้

ได้รับต้นฉบับ 10 สิงหาคม 2544 และให้ตีพิมพ์ 12 สิงหาคม 2544
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสาวผกายมาศ ปิณฑะดิษ สำนักงานวิจัย
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องเชื่อถือได้

Standard plasma นี้สามารถซื้อจากบริษัทผลิตน้ำยา หรือเตรียมเองจาก normal pooled plasma¹ (NP) โดยเตรียมจากเลือดคนปกติ ชายและหญิงจำนวนเท่ากันอย่างน้อย 10 คน ที่มีค่า coagulogram ปกติ หลังการปั่นแยกเลือด เก็บพลาสมาในตู้แช่แข็ง -15°C , -30°C และ -70°C เก็บโดยวิธีแช่แข็งธรรมดา และวิธี snap freeze หลังจากเก็บพลาสมาเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ นำมาตรวจคุณภาพและความคงสภาพของพลาสมาโดยใช้ APTT และ FVIII:C เป็นตัวชี้วัด ถ้า NP นี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมาก สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในโรงพยาบาลประจำจังหวัดได้เป็นการประหยัดค่า normal control plasma ที่ต้องซื้อจากบริษัทที่ผลิตน้ำยาจากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพ (quality) NP ที่เตรียมเอง เก็บที่อุณหภูมิ -15°C , -30°C และ -70°C โดยการแช่แข็งธรรมดา และวิธี snap freeze เก็บไว้นาน 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 สัปดาห์ ใช้การทดสอบ APTT และ FVIII:C เป็นตัววัด
2. ศึกษาความคงสภาพ (stability) ของ NP เมื่อเก็บไว้นาน 12 สัปดาห์

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียม NP เจาะเลือดจากคนปกติ ผู้ชาย 5 คน ผู้หญิง 5 คน คนละ 30 มล. โดยวิธี two syringe technique ใส่เลือดใน tube I, II, III ที่มี buffer citrate 1, 1 และ 0.3 มล. ตามลำดับ

Tube I plastic tube ขนาด 15 มล. ใส่เลือด 9 มล., tube II plastic tube ขนาด 15 มล. ใส่เลือด 9 มล. และ tube III plastic tube ขนาด 12 x 75 มม. ใส่เลือด 2.7 มล. แช่หลอดเลือดในน้ำแข็งตลอดเวลา นำหลอดเลือด tube III มาปั่นแยกพลาสมา และตรวจ

ค่า coagulogram (PT, APTT) พลาสมาคนที่มีความ coagulogram ปกติ จะถูกนำมาเตรียมเป็น NP ด้วยวิธีต่อไปนี้

วิธีที่ 1 Tube I

- 1.1 Citrated blood 10 มล.
- 1.2 ปั่นครั้งที่ 1 ที่ 5,000 rpm 10 นาที 4°C โดยใช้ refrigerator centrifuge แยกพลาสมาใส่หลอดพลาستيك
- 1.3 ปั่นครั้งที่ 2 ที่ 6,000 rpm 10 นาที แยกพลาสมาใส่ plastic tube
- 1.4 นำพลาสมา pool รวมกัน
- 1.5 แบ่งพลาสมาเป็น aliquot ละ 1 มล. snap freeze ด้วยน้ำแข็งแห้ง ผสม acetone หลังจากพลาสมาแข็งตัวแล้วนำไปเก็บที่ -70°C , -30°C และ -15°C code A, B, C ตามลำดับ

วิธีที่ 2 Tube II

- 2.1 Citrated blood 10 มล.
- 2.2 ปั่น 3,500 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ table centrifuge ธรรมดา
- 2.3 แยกพลาสมา นำมา pool รวมกัน
- 2.4 แบ่งพลาสมาเป็น aliquot ละ 1 มล. นำไปเก็บที่ -70°C , -30°C และ -15°C code D, E, F ตามลำดับ

2. การทดสอบ APTT และ FVIII:C

ทุก 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 สัปดาห์ นำ sample A, B, C, D, E, F มาทดสอบ APTT², FVIII:C³ ด้วยเครื่อง Coagulometer ACL Automated โดยใช้ calibration plasma ของ Instrumentation laboratory เป็น reference plasma และใช้ FVIII deficiency plasma ของคนไข้เป็น substrate

3. นำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมประสิทธิ์ของความผันแปร (coefficient of variation - CV) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิ -15°C , -30°C และ -70°C ของค่า

APTT และ FVIII ด้วย ANOVA with repeated measurement⁴ and multiple comparison by SNK test

ผลการศึกษา

ได้ทำการศึกษารวม 6 ชุด (case)

1. ผลการทดสอบ APTT แสดงค่า mean, SD และ CV ของ NP ชุดเดียวกันเก็บที่ 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 1 สรุปได้ว่า NP ที่เก็บ -15°C, -30°C และ -70°C โดยวิธีแช่แข็งธรรมดา เก็บไว้นาน 12 สัปดาห์ ค่า CV ของ APTT เท่ากับ 14.2, 5.0 และ 4.2 ตามลำดับ และโดยวิธีแช่แข็งอย่างรวดเร็ว ค่า CV ของ APTT เท่ากับ 11.4, 6.6 และ 3.3 ตามลำดับ แสดงว่าการเก็บที่ -70°C ทั้งโดยวิธีแช่แข็งธรรมดาและแช่แข็งอย่างรวดเร็ว เมื่อเก็บไว้นาน 12 สัปดาห์ ค่า CV ของ APTT มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

2. ผลการทดสอบ FVIII:C ค่า mean, SD และ CV ของ NP ชุดเดียวกันเก็บไว้นาน 12 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 1 สรุปได้ว่า NP ที่เก็บ -15°C, -30°C และ -70°C โดยวิธีแช่แข็งธรรมดา ค่า CV เท่ากับ 25.8,

19.8 และ 17.1 ตามลำดับ และโดยวิธีแช่แข็งอย่างรวดเร็ว ค่า CV เท่ากับ 28.3, 18.3, และ 17.6 ตามลำดับ แสดงว่า NP นี้ไม่เหมาะสมสำหรับการทำ FVIII:C เพราะ $CV > 10\%$

3. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการแช่แข็งแบบธรรมดา และการแช่แข็งแบบรวดเร็วที่อุณหภูมิต่างกัน ปรากฏว่าค่า APTT และ FVIII บางค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ แสดงในตารางที่ 2

4. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการแช่แข็งแบบธรรมดา และการแช่แข็งแบบรวดเร็ว ที่อุณหภูมิเดียวกันคือ -15°C, -30°C และ -70°C ให้ผลไม่แตกต่างกัน

วิจารณ์

การทดสอบเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดจำเป็นต้องมี normal control เป็นตัวควบคุมว่าการทดสอบทุกครั้งถูกต้อง เชื่อถือได้ การใช้ normal control ของบริษัทผู้ผลิตน้ำยา สะดวกสำหรับผู้ซื้อ แต่ราคาค่อนข้างแพง ราคาประมาณ 300-400 บาท ต่อ 1 มล. (ราคา พ.ศ. 2544) ซึ่งเมื่อเปิดขวดใช้จะมีอายุการใช้งานประมาณ

ตารางที่ 1 ค่า mean, SD, %CV ของ APTT และ FVIII แยกตามวิธีการแช่แข็งเก็บนาน 12 สัปดาห์

	-15 °C	-30 °C	-70 °C
APTT (second)			
Snap freeze : Mean $\pm$ SD	39.0 $\pm$ 4.4	36.9 $\pm$ 2.4	33.9 $\pm$ 1.1
%CV	11.4	6.6	3.3
Non snap freeze : Mean $\pm$ SD	42.2 $\pm$ 5.9	36.0 $\pm$ 1.8	34.0 $\pm$ 1.4
%CV	14.2	5.0	4.2
FVIII (%)			
Snap freeze : Mean $\pm$ SD	75.0 $\pm$ 21.2	90.1 $\pm$ 16.5	99.3 $\pm$ 17.4
%CV	28.3	18.3	17.6
Non snap freeze : Mean $\pm$ SD	70.5 $\pm$ 18.2	90.8 $\pm$ 17.9	104.3 $\pm$ 17.85
% CV	25.8	19.8	17.1

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่า mean ของ APTT และ FVIII ระหว่างการแช่แข็งแบบธรรมดาและแบบรวดเร็วที่อุณหภูมิต่างกันที่เวลา 8 สัปดาห์

		-15 °C	-30 °C	-70 °C
APTT (second)				
Snap freeze	: Mean $\pm$ SD	41.6 $\pm$ 0.7	38.9 $\pm$ 3.4	34.1 ^b $\pm$ 1.1
Non snap freeze	: Mean $\pm$ SD	39.7 $\pm$ 2.6	35.8 ^a $\pm$ 2.2	33.6 ^{bc} $\pm$ 1.9
FVIII (%)				
Snap freeze	: Mean $\pm$ SD	82.5 $\pm$ 20.2	93.5 $\pm$ 31.8	95.8 $\pm$ 21.2
Non snap freeze	: Mean $\pm$ SD	86.5 $\pm$ 25.1	101.3 $\pm$ 27.8	109.5 ^b $\pm$ 23.7

a อุณหภูมิ -30 °C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอุณหภูมิ -15 °C

b อุณหภูมิ -70 °C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอุณหภูมิ -15 °C

c อุณหภูมิ -70 °C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอุณหภูมิ -30 °C

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.05

1 วัน ในภาวะการณ์ปัจจุบันที่เศรษฐกิจบ้านเราไม่ดี การเลือกใช้ NP ที่เตรียมเองเป็น control เป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่ประหยัดและมีคุณภาพ NP นี้สามารถเตรียมได้เองจากคนปกติอย่างน้อย 10 คน เก็บที่ตู้แช่แข็ง -30 °C หรือ -70 °C เก็บนาน 12 สัปดาห์ ค่า APTT มีการเปลี่ยนแปลง (CV) น้อยกว่า 5% แสดงว่ามีคุณภาพดีเหมาะสมสำหรับเป็น normal control ได้ และสามารถนำไปใช้กับการทดสอบ prothrombin time, thrombin time, การทำ mixing test, การ assay factor VIII/IX inhibitor แต่ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็น standard plasma ในการ assay FVIII:C activity เนื่องจากเมื่อเก็บแช่แข็งไว้นานๆ FVIII:C ซึ่งเป็น labile factor จะสูญเสีย activity ได้ง่าย

NP ที่เตรียมเองนี้เสียค่าใช้จ่ายน้อยมาก อาจจะเสียค่าอาหารว่างสำหรับผู้บริจาค ค่าน้ำแข็งแห้ง สำหรับทำ snap freeze 30 บาทต่อ 1 กก. และค่า acetone แต่ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีตู้แช่แข็ง -30 °C หรือ -70 °C การเตรียม NP ครั้งหนึ่งจะเก็บได้นาน 12 สัปดาห์ ในตู้แช่แข็ง -30 °C หรือ -70 °C ค่าใช้จ่ายประมาณ 5 บาท/1 มล. แต่ถ้าเก็บที่ -15 °C เก็บได้เพียง 1-2 สัปดาห์

เท่านั้น

ข้อดีของ NP ที่เตรียมเองคือประหยัดค่าใช้จ่าย ช่วยลดเงินตราต่างประเทศ การเตรียมไม่ยุ่งยาก และเตรียมครั้งหนึ่งเก็บที่ -30 °C หรือ -70 °C ได้นาน 12 สัปดาห์

สรุป

1. คุณภาพ (quality) ของ NP ที่เตรียมเองเก็บที่อุณหภูมิ -15 °C, -30 °C และ -70 °C โดยการแช่แข็งธรรมดา และวิธี snap freeze เก็บไว้นาน 12 สัปดาห์ เมื่อทดสอบ APTT ปรากฏว่าที่ -30 °C และ -70 °C ทั้งวิธีแช่แข็งธรรมดาและวิธี snap freeze ค่า APTT เปลี่ยนแปลงน้อยมาก เหมาะสมจะนำไปใช้เป็น normal control ในการทำ screening coagulogram ทุกชนิด แต่ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็น standard plasma ในการทดสอบ FVIII:C activity เพราะค่า FVIII:C เปลี่ยนแปลงไปรวดเร็วไม่คงที่

2. ความคงสภาพ (stability) ของ NP โดยการแช่แข็งธรรมดาและวิธี snap freeze นาน 12 สัปดาห์ เก็บที่ -15 °C ค่า CV > 10%, เก็บที่ -30 °C ค่า CV 5.0-6.6%, เก็บที่ -70 °C ค่า CV 3.3-4.2% แสดงว่าการเก็บ

ที่ -70°C ทำให้ NP คงสภาพดีที่สุดโดยใช้ APTT เป็นเครื่องชี้วัด

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยรายได้คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ประจำปี 2541

เอกสารอ้างอิง

1. Kitchen S, McCraw A. *Diagnosis of Haemophilia and other Bleeding Disorders. A Laboratory Manual World*

- Federation of Hemophilia. Montreal, Canada, 2000.*
2. Proctor RR, Rapaport SI. *The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. Am J Clin Patho 1961;36:212-9.*
3. Biggs R. *Human Blood Coagulation, Hemostasis and Thrombosis. 4th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1972.*
4. John Neter, William Wasserman, Michael H. Kutner. *Applied Linear Statistical Models. 3rd ed. Richard D. Irwin Inc., 1990.*

The Quality and Stability of Normal Pooled Plasma for Coagulation Test

Pakaimas Bintadit, Sukunya Chotsupakarn, Umaporn Udomsubpakul, Werasak Sasanakul, and Ampaiwan Chuansumrit*.

*Research Center, *Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Ramathibodi Hospital, Rama VI Road, Bangkok, Thailand.*

Abstract: The quality and stability of normal pooled plasma (NP) were tested by activated partial thromboplastin time (APTT) and assay factor VIII clotting activity (FVIII:C), by using commercial calibration plasma as a standard plasma. NP was prepared from 5 males and 5 females who have normal coagulogram. NP was kept in aliquots at -15°C , -30°C and -70°C by normal freezing and snap freezing. These samples were tested APTT and FVIII:C at 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks. After 12 weeks the coefficient of variation (CV) of APTT at -15°C , -30°C and -70°C by normal freezing is 14.2, 5.0 and 4.2 percent respectively and by snap freezing technic CV is 11.4, 6.4 and 3.3 percent respectively. The CV of FVIII:C at -15°C , -30°C and -70°C by normal freezing and snap freezing are more than 10 percent. The conclusion of this study found that home made NP kept at -30°C and -70°C by normal and snap freezing is suitable to use as normal control for APTT since CV is less than 10 percent. This NP can be kept 12 weeks at both -30°C and -70°C . However, NP is not good to be standard plasma for FVIII:C assay since CV is changed more than 10 percent.

Key Words : ● Normal pooled plasma ● Activated partial thromboplastin time ● Factor VIII

Thai J Hematol Transf Med 2001;11:149-53.

