

**การวัด APTT, TT, PRT
ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท**
ประสิทธิ์ ชะวีรัมย์ และ นันทยา ชะวีรัมย์

=====

บทคัดย่อ รายงานนี้ ได้ขมาการวัดการเกิดก้อน clot ของการทดสอบ Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), Thrombin Time(TT) และ Plasma Recalcification Time (PRT) โดยหลักการวัดความเข้มข้นของแสงของเครื่องอ่านไมโครเพลทที่มีความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร โดยวิธีหลักของการเปลี่ยนความเข้มแสง (Absorbance) ที่เพิ่มขึ้น 0.05 หน่วย พบว่าให้ผลสอดคล้องกับวิธีที่ใช้หลอดทดลองและอ่านผลด้วยตาเปล่า วิธีที่พัฒนานี้ จะใช้ผลสมาปริมาณน้อยลง และสามารถที่จะนำไปใช้งานประจำวันได้ (คำรหัส : APTT, TT, PRT) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 23 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม 2533 หน้า 11-17

* อาจารย์ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract Determination of APTT, TT and PRT by Microplate Reader.

Chanarat P and Chanarat N.

The determination of clot formation of Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), Thrombin Time (TT) and Plasma Recalcification Time (PRT) by photo-optical method of microplate reader was developed. The principle of end-point clot determination was 0.05 increased in absorbance at 495 nanometer. The present method can reduce plasma volume used and the results were correlates well with 'tilt-tube' technic, which could be applied for routine use. (Key word : APTT, TT, PRT, clot detection) Bull Chiang Mai AMS 1990: 23: 11-17

การวัดการเกิดก้อน clot ในการทดสอบ APTT, TT หรือ PRT เริ่มมาจากการใช้วิธีการ 'tilt-tube' ในหลอดแก้ว⁽¹⁾ และสังเกตก้อน clot ที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า วิธีการ tilt-tube นี้ จะต้องใช้ผู้ทำการทดสอบที่ได้รับการฝึกฝนมาเป็นอย่างดี ผลการทดสอบจึงจะเป็นที่น่าเชื่อถือได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1950 ได้มีการพัฒนาใช้เครื่องกึ่งอัตโนมัติ (Semiautomate) ของ BBL Fibrometer อาศัยหลักการทาง electromechanics มาวัดก้อน clot ที่เกิดขึ้น และต่อมาในปี ค.ศ. 1970 เครื่องมือกึ่งอัตโนมัติได้ดัดแปลงเป็นเครื่องอัตโนมัติ โดยใช้หลักการตรวจวัดความเข้มของแสง ที่เกิดขึ้นเมื่อเกิดการ clot ด้วยกระบวนการของ fibrin polymerization เช่นเครื่องมือของบริษัท Organon Teknika Corp., Lancer; Medical Laboratory Automation, Inc. และ Ortho Diagnostic System ต่อมาได้มีการวัดโดยอาศัยหลักการของการวัดความหนืด ที่เปลี่ยนแปลง (Viscoelastic change) ได้

แก่เครื่อง Thromboelastograph (Helix GmGH), Sonoclot - Sienco, Inc, Hemachron (International Technidyne Corp.) และ Hepcon (Hemo Tec, Inc.)^(1,2) และในปัจจุบัน เครื่องมือที่ใช้ในการวัดการแข็งตัวของเลือด อาจจะมีการวัดเป็นแบบ coagulant, chromogenic และ/หรือ ใช้ immunologic assay ก็ได้ วัดทุกประสงค์ของรายงานนี้ เพื่อพัฒนาการทดสอบ APTT, TT, PRT โดยใช้การอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท ซึ่งในปัจจุบันได้มีจำหน่ายอุปกรณ์การทั่วไป

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. วิธี 'tilt-tube' เทคนิค

นำ citrated-plasma มาทดสอบ APTT, TT และ PRT ด้วยวิธีมาตรฐาน^(๓) และใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ Helena Laboratories

2. วิธี Photo-optical โดยใช้ Microplate reader (Biotek 307C)

2.1 APTT - ใช้ citrated plasma ที่อุณหภูมิ 37 °C จำนวน 75 ไมโครลิตร ผสมกับ APTT reagent 75 ไมโครลิตร และเติมยา CaCl_2 75 ไมโครลิตร เริ่มจับเวลา และวัดค่าค่าการตกตะกอนแสงที่ 495 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท

2.2 TT - ทำเช่นเดียวกับ 2.1 เว้นแต่ใช้ TT reagent แทน APTT reagent

2.3 PRT - ใช้ citrated plasma

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลของ APTT ระหว่างวิธี 'tilt-tube' และการอ่านด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท

No.	tilt-tube (sec.)	Microplate (sec.)
1	115	130
2	111	120
3	116	100
4	113	90
5	96	100

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลของ TT ระหว่างวิธี 'tilt-tube' และการอ่านด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท

No.	tilt-tube (sec.)	Microplate (sec.)
1	39	30
2	31	30
3	30	30

ที่อุณหภูมิ 37 °C 100 ไมโครลิตร เติม 1/40 M CaCl_2 100 ไมโครลิตร และเริ่มจับเวลา อ่านค่าการตกตะกอนแสงเช่นเดียวกับข้อ 2.1

ผลการทดลอง

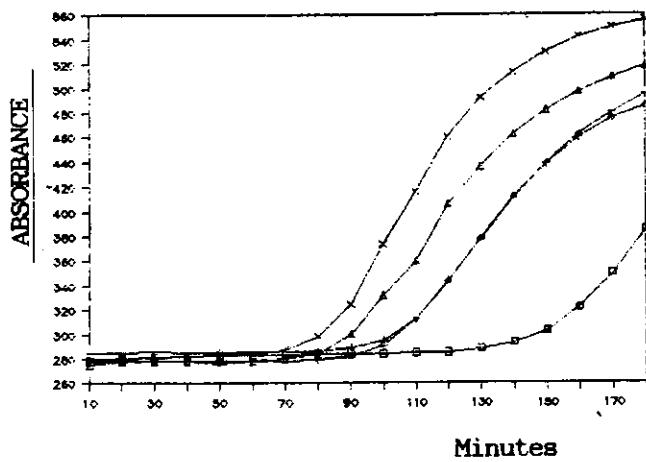
ค่าการตกตะกอนแสงที่เพิ่มขึ้น จากการเกิด coagulation ตามระยะเวลาต่างกัน ในการทดสอบ APTT, TT และ PRT แสดงไว้ในรูปแบบ 1, 2 และ 3 เมื่อกำหนดให้ค่าการตกตะกอนแสงที่สูงขึ้น 0.05 หน่วย เป็นจุด end point ระยะเวลาของแต่ละการทดสอบ เปรียบเทียบกับวิธี 'tilt-tube' ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1, 2 และ 3 พบว่าเมื่ออ่านด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท จะสัมพันธ์กับวิธีที่ใช้หลอดทดลองและอ่านด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลของ PRT ระหว่างวิธี 'tilt-tube' และการอ่านด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท

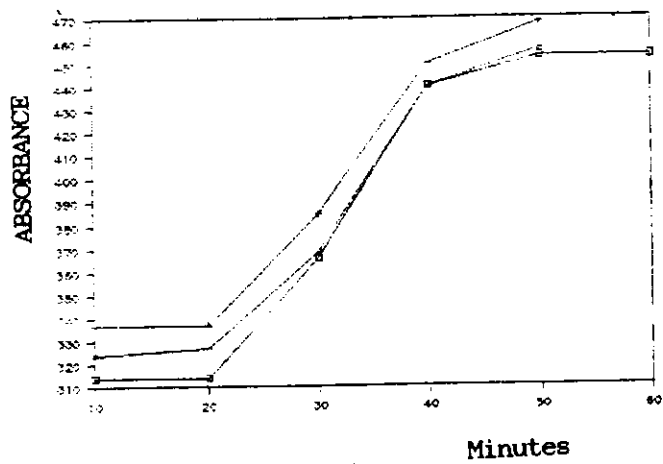
No.	tilt-tube (sec.)	Microplate (sec.)
1	118	130
2	108	110
3	100	110
4	97	90
5	113	90

วิจารณ์

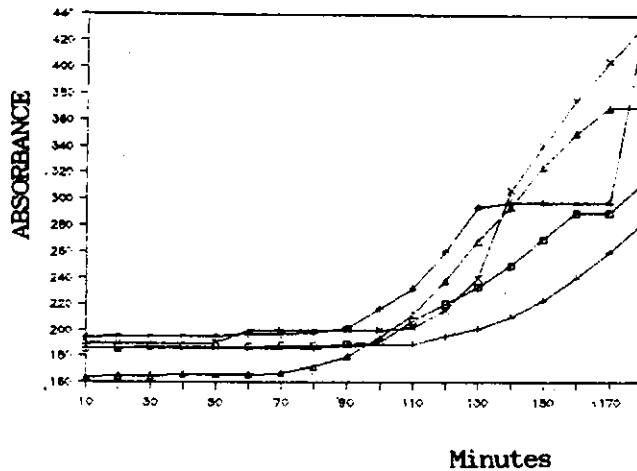
การพัฒนาการวัดการ clot ด้วยเครื่องมือแทนการดูด้วยตาเปล่า นั้น ได้เริ่มทำกันมานานเมื่อประมาณ 70-100 ปีมาแล้ว โดยงานเริ่มแรกของ Tonio ในปี ค.ศ. 1928 และ



รูปที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจากการเกิด coagulation ตามระยะเวลาต่างกันใน การทดสอบ APTT



รูปที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจากการเกิด coagulation ตามระยะเวลาต่างกันใน การทดสอบ TT



รูปที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจากการเกิด coagulation ตามระยะเวลาต่างกัน ในการทดสอบ PRT

ตารางที่ 4 เครื่อง Coagulometer ที่ใช้หลักการวัดก้อน clot โดยระบบ electromechanics

ชื่อเดิม	ชื่อทางการค้า
Vierordt - horse hair (1818)	Auto-Fi (Dade Division, American Hospital Supplies, Cooperation)
Brodie/Russel Coagulometer (1897)	Dybkaer/Kuster (1972)
Fuld/Schlesinger Instrument (1912)	Hyland Clotek (Travenol Laboratories, Inc.)
Cannon/Mendenhall Coagulometer (1914)	Coagulometer KC4 (H. Amelung GmbH)
	BBL, Fibrometer
	Depex Coagulometer (Depex d.v.)
	Coagulometer (H. Amelung GmbH)
	Dataclot 2 (Helena Laboratories)

Nygaard ในปี ค.ศ. 1941 และต่อมา Dade Division ได้พัฒนา Auto-Fi โดยใช้หลักการวัดทาง electromechanics ขึ้นในปี ค.ศ. 1878 เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้หลักการวัดทาง electromechanics ซึ่งจะวัด fibrin strand ที่เกิดขึ้น มีดังตารางที่ 4

College of American Pathologist ได้พบว่า 65% ของห้องปฏิบัติการในสหรัฐอเมริกา-

รักษา ได้ใช้เครื่องมือต่าง ๆ ดังกล่าว

การวัดการเกิดก้อน clot โดยอาศัยหลักการทาง photooptical method เริ่มต้นด้วย Kugelmass ในปี ค.ศ. 1923 และต่อมา Baldes และ Nygaard ได้ปรับปรุงให้ดีขึ้นในปี ค.ศ. 1936 ปัจจุบัน มีเครื่องมือต่างๆ ที่อาศัยหลักการนี้ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 Photo-optical clot detection system.

Name	Manufacturer	Status
Coagulyzer, Jr. II	Lancer	Semiautomated
Coagulyzer, Jr. III	Lancer	Semiautomated
Electra 750	Medical Laboratory Automation	Semiautomated
Coagulation Profiler CPS/CA15	Bio/Data Corporation	Semiautomated
Coag-a-Mate 2	General Diagnostics	Automated
Coag-a-Mate 2001	General Diagnostics	Automated
Coagulometer KC10	H.Amelung	Automated
Coagulyzer II	Lancer	Automated
Electra 500/600/700 series	Medical Laboratory Automation	Automated
Koaglab 40-A	Ortho	Automated
Coatron F	LRE	Automated

โดยทั่วไป การวัดด้วยระบบ photo-optical นี้ Koepke และ Klee ในปี ค.ศ. 1979(๔) ได้รายงานไว้ว่า เวลาที่ใช้จะสั้นกว่าวิธีวัดด้วยระบบ electromechanical instrument 6-15% แต่ในการทดลองของการศึกษา

ครั้งนี้ จะสัมพันธ์กับวิธีการดูดซับแสงแบบ 'tilt-tube' technic การวัดด้วยเครื่องอ่านนาฬิกาเฟลทวอร์นนี้ จำเป็นต้อง prewarm พลาสมามาก่อน ข้อเสียคือ ынขณะอ่านปฏิกิริยา เป็นการอ่านที่อุณหภูมิห้อง มีค่าที่ 37 °ซ เหมือน

เช่นเครื่องมือที่สร้างขึ้นมา สำหรับการตรวจวัด clot โดยเฉพาะ แต่ในปัจจุบัน เครื่องอ่านไมโครเพลท เช่น Biotek EL340 ได้พัฒนาให้มีการวัดแบบ kinetic ซึ่งจะทำได้ทั้งการวัดไปพร้อมกับการ incubate ที่ 37°C ได้ด้วย ซึ่งน่าจะได้รับการศึกษาเพิ่มเติม แต่การวัดด้วยระบบ photo-optical ยังมีข้อจำกัดสำหรับตัวอย่างพลาสมาที่มีความขุ่นเนื่องจากมีไขมันในเลือดสูง หรือมีการแตกของเม็ดเลือดแดงปนอยู่ หรือมีลิมโฟไซต์สูง หรือการใช้ยาที่มีความขุ่น

เอกสารอ้างอิง

1. Corrivean DM and Frisima GA. In Hemostasis and Thrombosis in

the Clinical Laboratory. JB Lippincott Co, 1988, p. 371.

2. Rowan RM and England JM. In Automation Assurance in Haematology. Blackwell Scientific Publ, 1986, p. 209.
3. Powers LW. In Diagnostic Hematology. The CV mosby Co, 1989, p. 479.
4. Kopke JA and Klee GG. Automated Coagulation detection system. Clin Lab Haematol 1979; 1: 75-86.

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, วท.ม. (สาขาวิทยาศาสตร์)
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่