

17. QUALITY CONTROL IN SCREENING BLOOD COAGULATION STUDIES

เดชา ร่มไทรย์ วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)*

การที่จะให้ผลการทดสอบใด ๆ ก็ตามมีความถูกต้อง, แม่นยำและเชื่อถือได้นั้น จำเป็นต้องอาศัยการควบคุมคุณภาพ ซึ่งประกอบไปด้วยการควบคุมเทคนิคในการทดสอบนั้น ๆ ให้ถูกต้อง, การควบคุมคุณภาพของน้ำยาและสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบให้ได้มาตรฐาน รวมทั้งการเปรียบเทียบผลการทดสอบนั้น ๆ กับห้องปฏิบัติการอื่น ๆ อีกด้วย

การเก็บตัวอย่างเลือด

การเจาะเลือดเพื่อทดสอบการแข็งตัวของเลือดนั้น จำเป็นต้องกระทำด้วยความระมัดระวัง ทั้งนี้เนื่องจากการทดสอบบางอย่าง เช่น partial thromboplastin time (PTT) จะให้ผลไม่ถูกต้องตามความเป็นจริง ถ้าพลาสม่านั้นมี tissue factor ปนอยู่ เพราะ tissue factor ที่อาจปนมาระหว่างการเจาะเลือด แม้ว่าจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยก็จะทำให้ factor X มี activity เพิ่มขึ้น และ factor X ยังสามารถ activate factor VIII ทำให้ factor VIII มี activity เพิ่มขึ้นได้หลายเท่าตัว⁽¹⁾ ซึ่งจะทำให้เวลา PTT มีค่าเร็วกว่าความเป็นจริง นอกจากนั้น tissue factor ที่ปนอยู่ในพลาสมายังอาจร่วมกับ factor VII แล้ว activate factor IX ซึ่งอยู่ใน intrinsic pathway อีกด้วย⁽²⁾ ดังนั้นการเจาะเลือดเพื่อทดสอบการแข็งตัวของเลือด จึงจำเป็นต้องระวังมิให้ tissue factor ปนเข้ามาในเลือด วิธีที่จะป้องกันการเจือปนของ tissue factor ที่ใช้กันในปัจจุบันมีสองวิธี คือ

1. two syringe method เป็นการเจาะเลือดโดยใช้ syringe ที่ทำด้วยพลาสติก 2 อัน โดยเตรียม syringe อันแรกต่อกับเข็มหมายเลข 20⁽³⁾ แล้วเจาะเลือดจากเส้นดำบริเวณข้อพับแขน ให้เข็มเข้าเส้นเลือดโดยให้มีเนื้อเยื่อปกปิดขนาดเล็กที่สุดโดยระวังไม่ให้เข็มความหนาเส้นเลือดมากนัก เป็นการป้องกัน tissue factor หลังออกมาจากเนื้อเยื่อมากเกินไป เมื่อเข็มเข้าเส้นเลือดดีแล้ว ดูดเลือดออกมาประมาณ 2 มล. แล้วปลด syringe ออกจากเข็มโดยที่เข็มยังคงอยู่ในเส้นเลือดแล้วใช้ syringe อันที่สองต่อเข้ากับเข็มอันเดิมที่เจาะอยู่ในเส้นเลือดแล้วดูดเลือดออกมาในปริมาณที่ต้องการ เลือดใน syringe ที่สองนี้จะมี tissue factor ปนอยู่น้อยกว่าใน syringe แรก ดังนั้นจึงใช้เลือดใน syringe อันที่สองในการทดสอบการแข็งตัวของเลือด

* ภาควิชาคลินิกโลหไมโครสโคปี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. one-syringe method with excess blood volume เป็นการเจาะเลือดโดยใช้ syringe ที่ทำด้วยพลาสติกหรือ syringe แก้วที่เคลือบด้วย silicone แล้วเพื่อลดการ activation ของ contact coagulation factors (factor XI และ XII) แล้วต่อ syringe ดังกล่าวด้วยเข็มหมายเลข 20⁽³⁾ เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำเช่นเดียวกับวิธีแรก แต่จุดเลือดออกมาให้ได้ปริมาณมากกว่าที่ต้องการประมาณ 1-2 มล. แล้วปล่อยเลือดที่เจาะออกมาได้นั้นลงในหลอดเก็บเลือดตามปริมาณที่ต้องการคงเหลือส่วนที่ติดเกินมาไว้ใน syringe (เลือดที่เข้า syringe ตั้งแต่เริ่มเจาะ) ซึ่งอาจนำไปใช้ในการทดสอบอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวกับส่วนต้นของการแข็งตัวของเลือดทาง intrinsic pathway ได้เช่น prothrombin time (PT) หรือ thrombin time (TT) เป็นต้น

ข้อควรระวังอีกประการหนึ่งของการเจาะเลือดก็คือการใช้สายยางรัดต้นแขน ซึ่งไม่ควรรัดไว้นานเกินไป เพราะจะทำให้ activity ของ coagulation factor หลาย factor เพิ่มขึ้นได้ 10-50 % และนอกจากนั้นยังทำให้ platelet ในตัวอย่างเลือดที่เจาะมีปริมาณต่ำลงอีกด้วย

สารกันเลือดแข็ง

สารกันเลือดแข็งส่วนใหญ่ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบการแข็งตัวของเลือดนั้นเป็นสารกันเลือดแข็งที่มีความสามารถในการยับยั้งแคลเซียม (coagulation factor IV) เช่น oxalate หรือ citrate แต่เนื่องจาก coagulation factor ชนิดที่เป็น labile factor (factor V และ VIII) จะลด activity ลงอย่างรวดเร็วใน oxalate มากกว่าใน citrate^(4,5) และยิ่งไปกว่านั้น oxalate ยังจับกับแคลเซียมแล้วเกิดตะกอนขึ้นในพลาสมา ซึ่งอาจจะรบกวนต่อการทดสอบที่ใช้เครื่องมืออัตโนมัติ โดยเฉพาะเครื่องมือที่จับเวลาการแข็งตัวของพลาสมาโดยอาศัยการเปลี่ยน optical density (OD) ของพลาสมาบางชนิดอีกด้วย⁽⁶⁾ ดังนั้นจึงนิยมใช้ citrate เป็นสารกันเลือดแข็งในการทดสอบการแข็งตัวของเลือด

ความเข้มข้นของ citrate ที่ใช้นั้นจะใช้ในระหว่าง 0.09 M - 0.15 M ความเข้มข้นที่มากกว่า 0.11 M เป็น hypertonic ต่อเซลล์และอาจทำให้ PT นานกว่าที่ควรจะเป็น⁽⁷⁾ โดยทั่วไปมักใช้ sodium citrate ในความเข้มข้น 3.8% (W/V) และในความเข้มข้นนี้ถ้าหากใช้ trisodium citrate $5.5 \text{ H}_2\text{O}$ จะทำให้ได้ความเข้มข้น 0.106 M แต่ถ้าหากใช้ dihydrate salt ในความเข้มข้นเดิม (3.8%) ก็จะทำให้ได้ 0.129 M ซึ่งสูงเกินไป จึงควรเปลี่ยนเสียใหม่โดยใช้ 3.13 % แทนซึ่งจะทำให้ได้ 0.106 M หรืออาจใช้ 3.2 % ก็ได้ ซึ่งจะทำ

ให้ได้ 0.109 M อันเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม⁽⁸⁾

อัตราส่วนของ citrate ต่อเลือดคือ 1 : 9⁽⁹⁾ โดยเติม citrate solution 1 ส่วนลงในหลอดที่จะใช้เก็บเลือดซึ่งควรเป็นหลอดพลาสติก⁽⁹⁾ แล้วเติมเลือดลงไปอีก 9 ส่วนผสมเลือดกับสารกันเลือดแข็งโดยการกลับหลอดทดลองไปมาไม่ต่ำกว่า 10 ครั้ง และต้องระวังมิให้เกิดฟองขึ้นเพราะจะทำให้ fibrinogen factor V และ factor VIII ลด activity ลง⁽¹⁰⁾ นอกจากนั้น ยังต้องดูดจากหลอดเลือดให้แน่นเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH ของเลือดอันจะทำให้ factor V และ VIII ลด activity^(11,12)

นอกจากนั้นหากปริมาณของ citrate ในพลาสมามากเกินไปจะทำให้ผลการทดสอบ PT, PTT^(11,13) และ PRT⁽¹⁴⁾ นานกว่าที่ควรจะเป็น เช่นในกรณีผู้ป่วยมี hematocrit สูงผิดปกติเมื่อเจาะเลือดผสมกับ citrate ในอัตราส่วนดังกล่าวแล้ว (1:9) จะทำให้อัตราส่วนของ citrate ต่อพลาสมาเพิ่มขึ้น หรือในกรณีที่ใช้ vacuum tube ที่เก็บไว้นานเกินไปทำให้เก็บเลือดก็อาจทำให้ความดันภายใน vacuum tube นั้น เปลี่ยนแปลงไปอันจะทำให้เจาะเลือดได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น

การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

พลาสมาที่ใช้ในการทดสอบการแข็งตัวของเลือดมีสองชนิดคือ ชนิดที่มี platelet ปนอยู่มาก (platelet rich plasma, PRP) ซึ่งใช้ในการทดสอบ plasma recalcification time (PRT) และพลาสมาที่มี platelet อยู่น้อย (platelet poor plasma, PPP) ซึ่งใช้ในการทดสอบอื่น ๆ เช่น PT, PTT หรือ TT การเตรียมพลาสมาทั้งสองชนิดนี้ต่างกันที่แรงในการ centrifuge เลือด

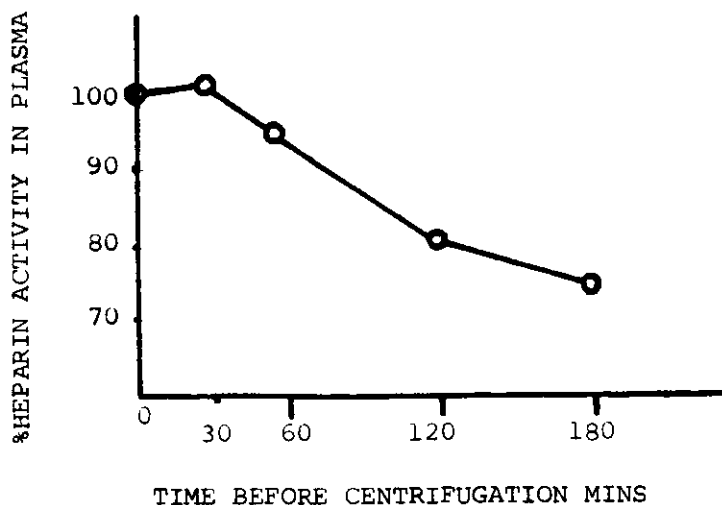
PRP เตรียมโดยนำเลือดที่ผสม citrate แล้วมา centrifuge 250 g⁽⁹⁾ เป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้ pasteur pipette ดูดแยกพลาสมาออกมาด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่ส่วนล่างยังไม่อัคแน่น

PPP อาจเตรียมได้จากเลือดที่เจาะออกมาผสม citrate หรืออาจใช้เลือดที่เหลือจากการเตรียม PRP ก็ได้ โดยนำเลือดดังกล่าวไป centrifuge 1400 g⁽¹⁵⁾ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงแยกพลาสมา

ระยะเวลาหลังจากเจาะเลือดจนกระทั่งนำเลือดมา centrifuge แยกพลาสมา ก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ผลการทดสอบเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะการตรวจวัดฤทธิ์ของ heparin

ฉบับพิเศษ ปีที่ 17 (3), 18 (1,2) 2528

ในพลาสมา เนื่องจาก platelet ในเลือดจะปล่อยสารที่มีฤทธิ์ต้าน heparin ออกมา (platelet factor 4) ซึ่งจะทำให้ฤทธิ์ของ heparin ในพลาสมาต่ำลงกว่าความเป็นจริง (รูปที่ 1) (3)



รูปที่ 1 ฤทธิ์ของ heparin ในพลาสมาเมื่อทำการแยกพลาสมาในเวลาต่างๆ กัน หลังจากเจาะเลือดออกมา (เดิม heparin ในพลาสมา 0.3 IU/ml แล้วเก็บเลือดไว้ในอุณหภูมิห้องในเวลาต่าง ๆ กัน จึงนำมา centrifuge แยกพลาสมามาตรวจวัดความเข้มข้นของ heparin โดยใช้การวัด anti - X_a, APTT และ TT) (3)

พลาสมาปกติ

ในการทดสอบการแข็งตัวของเลือดนั้น จะต้องทดสอบพลาสมาปกติควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง แล้วรายงานผลการทดสอบพลาสมาผู้ป่วยควบคู่ไปกับผลการทดสอบพลาสมาปกติ

พลาสมาปกตินั้นอาจใช้ที่มีขายทั่วไปในรูปของ lyophilized plasma หรืออาจเตรียมขึ้นเองก็ได้ พลาสมาปกติที่ใช้มีอายุการใช้งานต่างกันไป สำหรับ lyophilized plasma ที่มีขายทั่วไปนั้น มีอายุการใช้งานตามวันที่ผู้ผลิตระบุไว้ ส่วน fresh plasma ต้องทดสอบทันที พลาสมาที่เก็บที่ -70°C จะเก็บไว้ใช้ได้ภายใน 4 เดือนโดยไม่เสีย activity แต่ถ้าเป็น lyo-

philize plasma จะเก็บได้นานถึง 1 ปี

พลาสมาที่ reconstitute ด้วยน้ำกลั่นแล้วหรือพลาสมาที่แช่แข็งแล้วนำมาละลาย (taw) จะคงที่อยู่ได้นานเท่าใดนั้นส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลง pH ของพลาสมา นั้น พลาสมาที่ผสมบัฟเฟอร์ เมื่อละลายแล้วจะคงที่ได้นานถึง 8 ชั่วโมง⁽¹⁶⁾ แต่พลาสมาที่ไม่ได้ผสมบัฟเฟอร์ จะคงที่อยู่ได้ภายใน 2 ชม.⁽⁵⁾ ดังนั้นในการเตรียมพลาสมาปกติจึงควรเติมสารที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ลงไปผสมกับพลาสมา เช่น N-2-dydroxy ethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES) ซึ่งมีลักษณะเป็น switterion⁽¹⁷⁾

พลาสมาปกติอาจเตรียมได้โดยการนำพลาสมาของคนที่มีสุขภาพสมบูรณ์ปกติ 10 - 15 ราย ทั้งเพศชายและหญิง ยกเว้นหญิงที่รับประทานยาคุมกำเนิด เพราะในพลาสมาดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ของ coagulation factor บางชนิดสูงกว่าปกติ⁽¹⁸⁾ นำพลาสมาที่ได้มาผสมรวมกันแล้วเติม HEPES⁽¹⁷⁾ 1.19 กรัม ต่อพลาสมา 100 มล. กวนจนละลายทั่วกันแล้วแบ่งพลาสมาใส่ในหลอดพลาสมาเล็ก ๆ นำไป lyophilized หรือเก็บที่ -70°C

การสังเกต clot end point

การทดสอบการแข็งตัวของเลือดส่วนมากอาศัยหลักการว่าจะนำพลาสมามาเติมสารต่างๆ ที่จะใช้ทดสอบลงไปแล้ว จับเวลาตั้งแต่เติมสารนั้น ๆ จนกระทั่งพลาสมา นั้นแข็งตัว ดังนั้นการสังเกตดูว่าพลาสมา นั้นแข็งตัวเมื่อใดจึงเป็นสิ่งที่จะต้องฝึกหัดให้เกิดความชำนาญ

การสังเกตดู clot end point มีวิธีการที่นิยมอยู่สองวิธี คือ

tilt tube : คือการเอียงหลอดที่ใส่พลาสมาและน้ำยาที่ใช้ทดสอบให้ส่วนผสมไหลไปมาในหลอดทดลอง จนกระทั่งส่วนผสมนั้นหยุดไหลก็แสดงว่าพลาสมาแข็งตัวแล้ว การเอียงหลอดทดลองนั้น ให้เอียงขึ้นมาให้ได้มุม 90° จากแนวตั้ง แล้วแกว่งหลอดกลับมาให้ส่วนผสมไหลลงมารวมกันที่ก้นหลอดและให้หลอดนั้นจมลงใน water bath ทำเช่นนี้เป็นจังหวะสม่ำเสมอประมาณ 3 ครั้งต่อ 5 วินาที

automatic instrument : คือการใช้เครื่องมืออัตโนมัติในการทดสอบซึ่งอาศัยหลักการต่าง ๆ กันไปแล้วแต่บริษัทผู้ผลิต เช่นอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อพลาสมาแข็งตัวจะเปลี่ยนความสามารถในการนำไฟฟ้า (conductivity) หรือเปลี่ยนแปลง optical density เป็นต้น

การควบคุมคุณภาพของเครื่องมือเหล่านี้เป็น เรื่องที่ยากถึงแม้ว่าจะใช้วิธี benchmark system⁽¹⁹⁾ นั่นคือการเปรียบเทียบเครื่องมืออัตโนมัติของบริษัทต่าง ๆ กับ tissue thrombo-

ฉบับพิเศษ ปีที่ 17 (3), 18 (1,2) 2528

plastin หลายชนิดที่มีขายในท้องตลาดแล้วหาค่าอัตราส่วนของ PT ด้วย tissue thromboplastin และเครื่องมือแต่ละชนิดโดยกำหนดเครื่องมือชนิดหนึ่ง (fibrometer) และ thromboplastin ชนิดหนึ่งเป็นบรรทัดฐาน อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวอาจใช้ไม่ได้ผลนัก เนื่องจากเครื่องมือเหล่านั้นอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละเครื่องก็ได้ และ thromboplastin แต่ละชนิดที่ใช้ ถึงแม้ว่าจะมาจากบริษัทเดียวกันก็อาจจะมี activity ไม่เท่ากันก็ได้ ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการควบคุมคุณภาพของเครื่องมือเหล่านี้โดยเปรียบเทียบกับ thromboplastin มาตรฐานเช่น British comparative thromboplastin (BCT) แล้วรายงานเป็น ratio (international normalized ratio)⁽²⁰⁾ วิธีเปรียบเทียบจะได้อีกกล่าวดังต่อไปนี้

Clotting time

การทดสอบการแข็งตัวของเลือดทุกวิธีจะต้องทำการทดสอบซ้ำอย่างน้อยสองครั้ง (duplicate) เสมอ แล้วนำค่าทั้งสองมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยเสียก่อน ค่าที่ได้จะเป็นค่าที่เชื่อถือได้ก็ต่อเมื่อค่า duplicate นั้นต่างกันไม่เกิน 10%⁽¹⁵⁾

ตารางที่ 1 ความแตกต่างที่ยอมรับได้ของค่า duplicate ของ clotting time

Clotting time	acceptable difference between duplicate
up to 20 seconds	1 second
20 - 60 seconds	2 seconds
60 - 100 seconds	3 seconds
over 100 seconds	up to 5 seconds

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ PROTHROMBIN TIME

พลาสมาที่ใช้ในการทดสอบ PT-คือ PPP ดังที่ได้กล่าวมาแล้วพลาสมานี้ควรมีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบทันทีที่แยกพลาสมาหรือไม่ควรเกิน 2 ช.ม. หลังจากเก็บตัวอย่างเลือด⁽³⁾

วิธีทดสอบ PT นั้นทำโดยใช้หลอดทดลองขนาด 12 X 75 mm. ที่สะอาดใส่ลงใน water bath 37°C แล้วเติม thromboplastin 0.1 มล., พลาสมา 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 0.025 M แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 มล. ลงไปในหลอดทดลองพร้อมทั้งเริ่มจับเวลา สังเกต clot end point ด้วยวิธี tilt tube ดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว

อย่างไรก็ตามการทดสอบ PT นั้นอาจจะได้ค่าที่แตกต่างกับห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมผลของการทดสอบ

สิ่งสำคัญที่สุดที่ทำให้ค่า PT เปรียบเทียบกันไม่ได้ นอกจากเทคนิคและน้ำยาที่ใช้แล้ว thromboplastin ก็มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่ใช้เตรียมก็มีฤทธิ์ในการทำให้พลาสมาแข็งตัวต่างกัน, thromboplastin จากสัตว์ต่างชนิดกันก็มีฤทธิ์ต่างกัน ยิ่งไปกว่านั้นในการเตรียมแต่ละครั้งก็ยังได้ thromboplastin ที่มีฤทธิ์ต่างกันอย่างไรก็ตามเป็นที่ยอมรับกันว่า thromboplastin ที่ได้จากสมองคนจะ sensitive ที่สุด เมื่อทดสอบกับพลาสมาของคน⁽³⁾

การ standardized thromboplastin นั้นอาจใช้วิธี British system ซึ่งมี thromboplastin ที่มีมาตรฐาน นั่นคือ International reference preparation (Institute for biological standard and control, Holly Hill, Hampstead London NW3 6RB, UK) หรือจากองค์การอนามัยโลก (WHO, International reference preparation for thromboplastin, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam) เพื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จาก thromboplastin ที่ใช้อยู่⁽²¹⁾

การ standardized tissue thromboplastin นั้น⁽²²⁾ ขั้นแรกเราต้องเตรียม working reference preparation ของ brain thromboplastin ขึ้นมาเสียก่อน ซึ่งอาจจะใช้วิธีสกัดจากสมองคนด้วยน้ำเกลือ แล้วนำ thromboplastin ที่เตรียมได้นี้ มาทดสอบเพื่อหา international sensitivity index ของ working preparation นี้เสียก่อน (ISI_{WRP}) โดยใช้ International reference preparation ของ thromboplastin จากองค์การอนามัยโลกมาทดสอบหาเวลา จากพลาสมาของคนปกติ และพลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา couvarin เทียบกับค่าที่ได้จาก working reference preparation ที่เราเตรียมขึ้นโดยใช้พลาสมาปกติ 2 รายและพลาสมาผู้ป่วย 6 รายทำการทดสอบเรียงตามตารางที่ 2 ทำเช่นนี้เป็นเวลา 10 วัน จึงนำค่าทั้งหมดมาคำนวณ ISI_{WRP}

ตารางที่ 2 ลำดับขั้นตอนของการทดสอบ PT เพื่อการ calibrate working reference preparation ของ brain thromboplastin (ตัวอย่างเช่นให้ทำ PT ของ พลาสมาปกติรายที่ 1 ด้วย international reference ก่อนแล้วจึงทำ PT ของพลาสมาดังกล่าวด้วย working reference ต่อมาทดสอบ PT ของพลาสมาผู้ป่วยรายที่ 2

ด้วย reference preparation ตามลำดับ)

Sample	international reference	working reference
normal 1	1	2
patient 1	3	4
patient 2	5	6
patient 3	7	8
patient 4	9	10
patient 5	11	12
patient 6	13	14
normal 2	15	16

นำค่า PT ที่ได้จากการทดสอบข้างต้นมาคำนวณ ISI_{WRP} โดยใช้ค่า slope ของกราฟ (log-log) ระหว่าง PT ที่ได้จาก thromboplastin ทั้งสองชนิดนั้น ($C_{IRP, WRP}$) คูณกับค่า ISI ของ international reference preparation (ISI_{IRP}) ที่แจ้งมาพร้อมกับ international reference thromboplastin จากองค์การอนามัยโลก ค่า ISI_{IRP} นั้น ได้มาจากการเปรียบเทียบกับ BCT $C_{IRP, WRP}$ อาจคำนวณได้จาก orthogonal regression ดังนี้

$$C_{IRP, WRP} = m + VM^2 + 1$$

$$m = \frac{\epsilon(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})^2 - \epsilon(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})^2}{2\epsilon(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})}$$

$$V = \frac{\epsilon(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})^2 - C_{IRP, WRP}(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})}{n - 2}$$

LPT_{IRP} = logarithm ของค่า PT แต่ละครั้งเมื่อใช้ international reference preparation

$\overline{LPT}_{IRP}$ = mean ของค่า LPT_{IRP}

LPT_{WRP} = logarithm ของค่า PT แต่ละครั้งเมื่อใช้ working reference preparation

$\overline{LPT}_{WRP}$ = mean ของค่า LPT_{WRP}

ดังนั้นจากสูตรการคำนวณข้างต้นจึงพอจะทำให้ง่ายขึ้นได้ด้วยสูตรต่อไปนี้ คือ

$$C_{IRP.WRP} = \frac{\frac{\epsilon(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})^2 + \frac{1}{m}(\frac{1}{m} + 1)}{n - 2} + \frac{\frac{1}{m^2} + \epsilon(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})}{n - 2}}$$

เมื่อได้ค่า ISI_{WRP} แล้ว tissue thromboplastin ที่เตรียมขึ้นมาในครั้งนี้นี้ก็จะใช้เป็น standard สำหรับการเทียบกับ tissue thromboplastin ที่เตรียมขึ้นใหม่ครั้งต่อไป เพื่อคำนวณหา ISI ของ thromboplastin batch ใหม่ (ISI_b) ด้วยวิธีที่คล้ายกับการทดสอบเพื่อหา ISI_{WRP} แล้วคำนวณ ISI_b ด้วยสูตร

$$ISI_b = ISI_{WRP} \times C_{WRP.b}$$

$C_{WRP.b}$ คือค่า slope ของกราฟ (log-log) ที่ได้จากการทดสอบ PT ของพลาสมาปกติและพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา coumarin โดยทดสอบเทียบระหว่าง thromboplastin ที่เป็น working reference preparation กับ thromboplastin ที่เตรียมขึ้นใหม่

ดังนั้นเมื่อทำการทดสอบ PT ของพลาสมาผู้ป่วยด้วย thromboplastin ที่รู้ค่า ISI_b แล้วก็จะรายงานในรูปของ international normalized ratio (INR) ได้ โดยใช้สูตร

$$INR = R^{ISI_b}$$

$$R = \frac{\text{patient PT}}{\text{normal PT}}$$

ฉบับพิเศษ ปีที่ 17 (3), 18 (1,2) 2528

$$\text{ตัวอย่างเช่น } \text{ISI}_{(b)} = 1.5$$

$$\text{ของผู้ป่วย} = 28 \text{ วินาที}$$

$$\text{ของพลาสมาปกติ} = 12 \text{ วินาที}$$

$$\therefore R = 28/12 = 2.33$$

$$\text{INR} = 2.33^{1.5} = 3.55$$

หรืออาจใช้อีกวิธีหนึ่งที่ง่ายกว่านี้ก็คือใช้สูตร

$$\text{INR} = \text{antilog} (\text{ISI} \times \log R)$$

$$\therefore \text{INR} = \text{antilog} (1.5 \times \log 2.33) = 3.56$$

หรืออาจเตรียมตารางสำหรับ INR ไว้ก่อนก็ได้เช่นตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตารางสำหรับเปลี่ยนค่า prothrombin time ratio ให้เป็น international normalized ratio (INR) สำหรับ thromboplastin ที่มี ISI_b 1.5

Measured ratio	INR	Measured ratio	INR
1.0	1.0	2.3	3.5
1.1	1.2	2.4	3.7
1.2	1.3	2.5	4.0
1.3	1.5	2.6	4.2
1.4	1.7	2.7	4.4
1.5	1.8	2.8	4.7
1.6	2.0	2.9	4.9
1.7	2.2	3.0	5.2
1.8	2.4	3.1	5.5
1.9	2.6	3.2	5.7
2.0	2.8	3.3	6.0
2.1	3.0	3.4	6.3
2.2	3.3	3.5	6.5

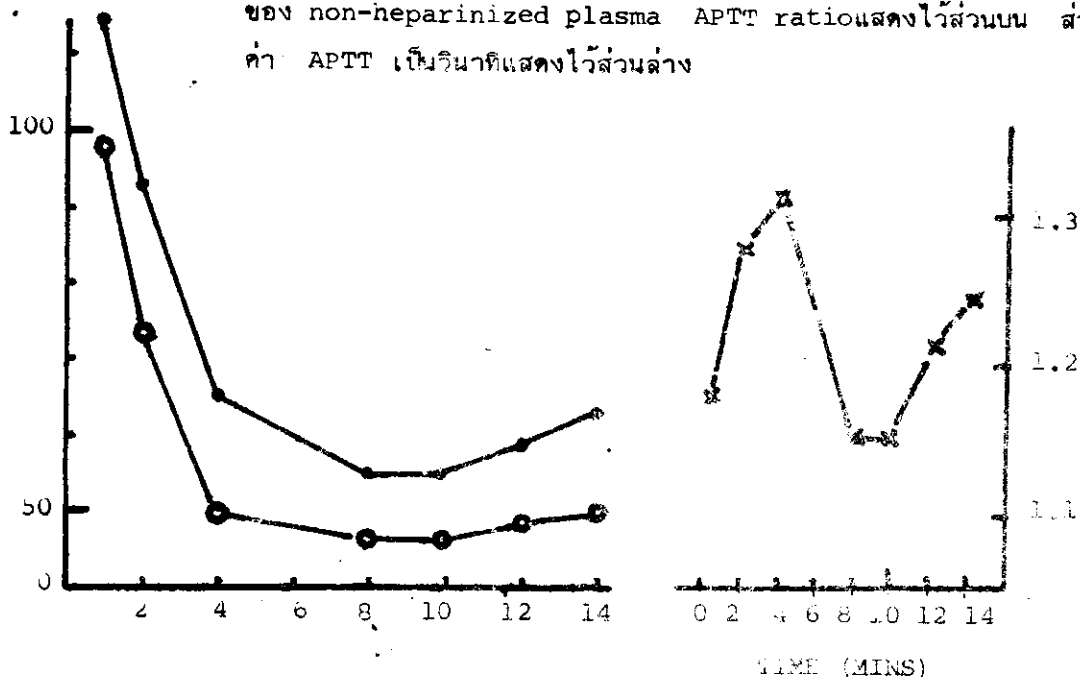
การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME (PTT)

PTT เป็นการทดสอบการแข็งตัวของเลือดทางด้าน intrinsic pathway ซึ่งอาศัย factor XII, XI, IX, VIII, X, V, II และ I ตามลำดับ การทดสอบนี้อาศัย crude cephalin ซึ่งเตรียมจากสมองโดยการสกัดด้วย organic solvent⁽²³⁾ ใช้แทนสารที่ช่วยในการแข็งตัวของพลาสมาที่มาจาก platelet (Platelet factor sensitivity 3) นอกจากนั้นยังมีการเติม activator สำหรับ factor XII เช่น kaolin⁽²⁴⁾ ลงไปด้วยเพื่อเพิ่มของการทดสอบนี้จึงมักเรียกการทดสอบดังกล่าวว่า activated partial thromboplastin time (APTT)

ค่า APTT อาจเปลี่ยนแปลงไปได้ด้วยสาเหตุหลายประการคือ

1. วิธี activate factor XII⁽²⁵⁾ พบว่าเวลาในการแข็งตัวของพลาสมานั้น อาจเปลี่ยนแปลงไปได้จากความเข้มข้นของ activator, ชนิดของ activator รวมทั้งเวลาในการ activate ดังนั้นจึงควรสั่งซื้อหรือเตรียม crude cephalin ครั้งละมาก ๆ นอกจากนั้น เวลาในการ activate ก็จะต้องเป็นไปตามที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ การเปลี่ยนแปลง APTT เมื่อใช้ เวลาในการ activate ต่าง ๆ กันได้แสดงไว้ในรูปที่ 2⁽³⁾

รูปที่ 2 ผลของเวลาในการ activate พลาสมาด้วย kaolin —●— คือ APTT ของ heparinized plasma (0.06 IV/ml) —○— คือ APTT ของ non-heparinized plasma APTT ratio แสดงไว้ส่วนบน ส่วน ค่า APTT เนิบวินาทีแสดงไว้ส่วนล่าง



ฉบับพิเศษ ปีที่ 17 (3), 18 (1,2) 2528

2. การใช้บัฟเฟอร์สำหรับละลาย kaolin และ phospholipid : พบว่าถ้าใช้ Owren's buffer แทน normal Saline ก็จะทำให้การทดสอบนั้นมี sensitivity ต่อ heparin ดีขึ้น⁽³⁾ (Owren's buffer : 11.75 g sodium diethylbarbiturate, 14.67 g. NaCl, น้ำกลั่น 1570 ml, 0.1 NHCl 430 ml, pH 7.35)

3. phospholipid : ถึงแม้ว่า phospholipid จากสัตว์ต่าง species กัน อาจจะไม่มีความแตกต่างกันก็ตามแต่วิธีในการสกัด phospholipid นั้นอาจทำให้ได้สารที่มี pro-coagulant ต่างกันได้ สำหรับ phospholipid ที่ซื้อจากบริษัทผู้ผลิตจะมีการ standardize โดยผู้ผลิตแต่หากว่าจะเตรียมขึ้นใช้เองก็ควรจะทดสอบเพื่อหา dilution ที่เหมาะสมทั้งด้วย พลาสมาปกติ, พลาสมาที่ขาด coagulation factor รวมทั้ง heparinized plasma

phospholipid ที่เตรียมขึ้นใช้มักจะถูก oxidize เมื่อเก็บไว้นาน ๆ และทำให้ clotting time เปลี่ยนไป⁽²⁶⁾ ดังนั้นจึงอาจใช้ butylated hydroxyanisole (BHA) ในความเข้มข้น 0.1 mM. เติมลงใน solvent ทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมรวมทั้ง acetone ด้วย BHA เป็นสาร antioxidant และช่วยลดการ oxidation ของ phospholipid ที่เตรียมได้

4. วิธีทดสอบ⁽³⁾ ใส่หลอดทดลองขนาด 12 X 75 mm. หลอด 0.025 M Calciumchloride, หลอด kaolin suspension (0.5 g/100 ml. Owren's buffer) : หลอด diluting fluid (200 ml. Owren's buffer, 200 ml 0.025 M sodium citrate, 600 ml 0.9% NaCl) และหลอด cephalin suspension ลงใน water bath 37°C จนกระทั่งสารละลายต่าง ๆ มีอุณหภูมิ 37°C แล้วจึงเติมสารต่าง ๆ ต่อไปนี้ลงในหลอดทดลองที่ใส่ไว้จนอุณหภูมิ 37°C, 0.2 ml. diluting fluid, 0.2 ml พลาสมา, 0.2 ml cephalin suspension และ 0.1 ml kaolin suspension แล้วเริ่มจับเวลา tilt tube 3 ครั้ง เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน หลังจากนั้น tilt tube ต่อไป นาทีละ 1 ครั้ง จนครบ 10 นาทีพอดี เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.2 ml พร้อมทั้งเริ่มจับเวลาด้วยนาฬิกาเรือนที่สองแล้ว tilt tube 3 ครั้ง เพื่อผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากัน แล้ววางหลอดทดลองลงใน water bath จนถึง 30 วินาที จึงให้สังเกต clot end point ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น ค่าปกติที่ได้จากวิธีนี้คือ 38 - 40 วินาที

วิธี standardization ของ APTT ในขณะนี้ยังมีปัญหาอยู่เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบค่า APTT กับ reference preparation ของ crude cephalin จากองค์การอนามัยโลกนั้นผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการส่วนมากยังไม่ correlate กัน⁽³⁾ อย่างไรก็ตามจากการสำรวจผลของ APTT ในประเทศอังกฤษ⁽²⁷⁾ พบว่า crude cephalin ส่วนมากที่ใช้ในการทดสอบ

APTT นั้น สามารถแยก mild hemophilia จากคนปกติได้ ดังนั้นปัญหาของการ standardized ของ APTT จึงขึ้นอยู่กับการใช้ค่า APTT ในการควบคุมการรักษาที่ใช้ heparin แต่อย่างไรก็ตาม การควบคุมการรักษาที่ใช้ heparin นั้นอาจควบคุมด้วยวิธีอื่นได้นอกจาก APTT

สรุป

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบการแข็งตัวของเลือดนั้น มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับ ตั้งแต่เริ่มต้นเจาะเลือดออกมาเพื่อทดสอบ จนถึงการรายงานผล เพื่อให้จะได้ค่าที่ถูกต้องและ เปรียบกันได้กับห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยเฉพาะการทดสอบ prothrombin time ซึ่งเป็นการทดสอบการแข็งตัวของเลือดทางด้าน extrinsic pathway และมีความสำคัญในการควบคุมการรักษาผู้ป่วยด้วย coumarin ในการนี้ควรที่ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ จะ ได้มีการเตรียม working reference preparation ของ thromboplastin ขึ้นเพื่อจะได้ เปรียบเทียบผลการทดสอบกับห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Martens, K. and Bertina, R.M. : Activation of human coagulation factor VIII by activated factor X, the common product of the intrinsic and the extrinsic pathway of blood coagulation. *Thromb. Haemostas.* 47 : 96, 1982.
2. Osterud, B. and Rapaport, S.T. : Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII : Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 6260, 1977.
3. Barrowcliffe, T.W. : Standardization of coagulation tests and assays. In *Method in hematology Vol 4, Quality control.* Cavill, I. ed. Churchill Livingstone Inc : New York, 1982 p. 51.
4. Loeliger, E.A. : Laboratory reagents and coagulation assay procedures. *Bull. W.H.O.* 48 : 727, 1973.
5. Bairrington, J.D. and Peterson, E.W. : The laboratory control of anticoagulant therapy. The one-stage prothrombin time-Quality control in coagulation procedures. *Am.J.Med.Tech.* 33 : 296, 1967.
6. Brown, B.A. : Automation. In *Hematology, principle and procedures*, 3rd ed., Lea and Febiger, U.S.A., 1980, p 263.
7. Ingram, G.E.C. and Hills, M. : The prothrombin time test : Effect of varying citrate concentration *Thromb. Haemostas.* 36:230, 1976.

ฉบับพิเศษ ปีที่ 17 (3), 18 (1,2) 2528

8. Ingram, G.I.C. and Hills, M. : ICTH reference method for the one stage prothrombin time test on human blood. *Thromb. Haemostas.* 36: 237, 1976.
9. Biggs, R. : the preparation of general reagents and coagulation factors. In *Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis*. 2nd. ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1976, p 657.
10. Serridge, M.S. : *Laboratory evaluation of hemostasis.*, Lea and Febiger, U.S.A., 1974., p 190.
11. Koepke, J.A., Rodgers, J.L. and Ollivier, M.J. : Preinstrumental variables in coagulation testing. *Am.J.Clin.Pathol.* 64 : 591, 1975.
12. Schoen, I., Praphai, M. and Veiss, A. : storage stability and quality control of prothrombin time by means of the Quick method. *Am. J.Clin.Pathol.* 37 : 374, 1962.
13. Peterson, P. and Gottfried, E.L. : The effects of inaccurate blood sample volume on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT). *Thromb. Haemostas.* 47 : 101, 1982.
14. Romcai, D., Tositarat, T. and Kulapongs, P. : The effects of varying hematocrit values on PRT, APTT and PT test. *Bull.Med.Tech.Ass. Thailand* 7 : 80, 1978.
15. Austen, D.E.G. and Rhymes, I.L. : *A laboratory manual of blood coagulation*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1975.
16. Chak, I.M. and Giri, K.V. : Effect of ultrafiltration carbondioxide on the prothrombin activity of plasma. *Naute* 159 : 924, 1970.
17. Zucker, S., Cathey, M.H. and West, B. : Preparation of quality control specimens for coagulation. *Am.J.Clin.Pathol.* 53:924, 1970.
18. Miale, J.B. and Kent, J.W. : The effect of oral contraceptives on the results of laboratory tests. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 120:264, 1974
19. Koepke, J.A., Gilmer, P.R. Jr., Triplett, D.A. and O'Sullivan, M.B. : The prediction of prothrombin time performance using secondary standards. *Am.J.Clin.Pathol.* 68 : 191, 1977.
20. Poller, L. : Quality control in blood coagulation. In *Blood coagulation and haemostasis : A practical guide*. Thomsen, J. Med., 2nd ed. Churchill Livingstone, New York., 1980, p 331.
21. Biggs, R. and Denson, K.W.E. : Standardization of the one - stage prothrombin time for the control of anticoagulant therapy. *Br.Med. J.* 1 : 84, 1967.
22. Recommended methodology for using WHO international reference preparations for thromboplastin. Centraal Laboratorium voor de bloedtransfusiedienst, Amsterdam.

23. Bell, W.N. and Alton, H.G. : A brain extract as a substitute as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test. *Nature* 174 : 880, 1954.
 24. Waaler, B.A. : Contact activation in the intrinsic blood clotting system. *Scand. J.Clin.Lab.Invest.Suppl.* 11 : 37, 1959.
 25. Lena Lan, J.G. and Phillips, G.E. : Some variables which influence the activated partial thromboplastin time assay. *Clin.Chem.* 12:269, 1966.
 26. Barrowcliffe, T.W., Gutteridge, J.M.C. and Dormandy, T. L. : The effect of fatty acid autoxidation products on blood coagulation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 33 : 271, 1975.
 27. Ingram, G.I.C. and North, W.R.S. : The diagnosis of mild haemophilia by the partial thromboplastin time test. WFH/ICTH study of the Manchester method. *Thromb. Haemostas.* 45 : 162, 1981.
-