Home-made Pooled Normal Plasma สำหรับการตรวจการแข็งตัวของเลือด

อ. ดร. สุมนา ดาเก็ง

Pooled normal plasma (PNP) คือ พลาสมามาตรฐาน (standard human plasma) ที่ใช้ในการวัดปริมาณปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (factor assays) และใช้สำหรับเป็น control plasma ในการตรวจเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด PNP เตรียมได้โดยการนำพลาสมาของคนปกติ (normal healthy individual) มารวมกันอย่างน้อย 20 รายขึ้นไป ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมนั้นจะต้องมีกระบวนการเลือก normal healthy individual ที่ดี และมีการสอบเทียบกับ WHO International Standard (IS) เพื่อให้ทราบค่าที่แท้จริงของ coagulation factors ต่างๆ[1-2] ถ้าห้องปฏิบัติการสามารถเตรียม PNP ใช้ได้เองจะช่วยประหยัดงบประมาณได้มาก

การเตรียม pooled normal plasma มีขั้นตอนและข้อแนะนำดังนี้

1. เลือกผู้บริจาคเลือดที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-50 ปี จำนวนอย่างน้อย 20 ราย โดยมีเพศชายและหญิงในจำนวนเท่าๆ กัน มีค่า hematocrit ปกติ ไม่มีประวัติเลือดออกผิดปกติ รวมถึงไม่กินยาที่มีผลกระทบต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือดและ coagulation factors เช่น aspirin และยาจำพวก steroid ผู้บริจาคต้องมีผลการตรวจ infectious disease markers ได้แก่ HBsAg, anti-HCV, anti-HIV, HIV Ag และ syphilis เป็นลบ
2. สารกันเลือดแข็งที่ใช้ คือ 3.2% trisodium citrate ซึ่งรบกวนผลการทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือดน้อยกว่า 3.8% trisodium citrate โดยอัตราส่วนของเลือดและสารกันเลือดแข็งที่ใช้เท่ากับ 9 : 1 (ค่า hematocrit ของผู้บริจาคเลือดควรอยู่ในช่วง 35-45%)[3]
3. กระบอกฉีดยาและหลอดทดลองที่ใช้ควรเป็นพลาสติกเพื่อลดการกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดซึ่งจะมีผลต่อค่า clotting time และค่า coagulation factors ต่างๆ
4. เจาะเลือดโดยใช้ butterfly needle เบอร์ 21 และไม่ควรใช้สายยางรัดแขนนานเกิน 1 นาที เพราะจะทำให้ fibrinogen มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น และเกิดการกระตุ้น FVII และ FVIII ให้ทำงานมากขึ้น ไม่ควรใช้เลือดจากผู้บริจาคของธนาคารเลือดเนื่องจากในการบริจาคเลือดแต่ละครั้งต้องใช้สายยางรัดแขนนาน 5-10 นาที
5. เตรียม platelet poor plasma ทันทีหรือภายใน 4 ชั่วโมง ตั้งแต่เริ่มเจาะเลือด โดยนำเลือดไปปั่นแยกใน refrigerated centrifuge อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 2,500 g นาน 15 นาที แบ่งพลาสมาส่วนหนึ่งไว้สำหรับการทดสอบค่า APTT พลาสมาส่วนที่เหลือจะเก็บไว้ที่ –70°C
6. การทดสอบค่า APTT จะทำ 2 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย APTT ของผู้บริจาคแต่ละราย โดยจะเลือกเฉพาะพลาสมาที่มีค่า APTT อยู่ในเกณฑ์ปกติ คือ mean ± 2SD มาทำ PNP ในกรณีที่พบค่าผิดปกติให้เก็บเลือดเพิ่มเติมจนครบ 20 ราย
7. ควรปั่นพลาสมาที่เลือกแล้วว่ามีค่า APTT อยู่ในเกณฑ์ปกติอีกครั้งเพื่อให้เกล็ดเลือดตกมากที่สุดและลดการรบกวนของเกล็ดเลือดต่อค่า clotting time หากต้องการนำ PNP ไปใช้ในการทดสอบ lupus anticoagulant (LA) จำนวนเกล็ดเลือดที่หลงเหลืออยู่ไม่ควรเกิน 10,000/μL[4]
8. เก็บพลาสมาแต่ละหลอดรวมเป็น pooled plasma และทดสอบ APTT ซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของ PNP ทั้งชุด ซึ่งค่าที่ได้ต้องอยู่ในช่วงปกติ
9. แบ่งพลาสมาใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml หลอดละ 0.5 ml ปิดจุกให้เรียบร้อยแล้วนำไปแช่แข็งโดยเร็ว (snap freeze) โดยการใช้วิธีการต่างๆ เช่น ใส่ใน deep freezer, แช่ใน ethanol bath, แช่ใน dry ice หรือ liquid nitrogen หลังจากนั้นจึงนำ PNP ไปเก็บไว้ที่ –70°C โดยสามารถเก็บไว้ได้นานเกิน 6 เดือน

การทำ PNP calibration

การเตรียม PNP เพื่อใช้เองในห้องปฏิบัติการจะต้องมีการทำ calibration ทุกครั้งก่อนนำไปใช้เป็น standard plasma สำหรับการทดสอบปัจจัยการแข็งตัวของเลือด เนื่องจาก PNP ที่เตรียมได้โดยวิธีนี้จะมีปริมาณ FII, V, VII, IX, X, XI, XII, HMWK และ prekallikrien ประมาณ 1.0 U/ml แต่จะมีค่า FVIII และ von Willebrand factor (vWF) ที่แตกต่างกันมากในแต่ละชุดที่เตรียม การทำ PNP calibration จะทำให้ทราบปริมาณที่แท้จริงของ coagulation factors โดยเฉพาะ FVIII และ vWF เป็น International Units (IU) การทำ calibration จะทำเทียบกับ calibrated WHO reference preparations ซึ่งเตรียมโดย National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC; Potters Bar, UK) หรือใช้ commercial reference plasma ที่ได้ทำการ calibrated มาแล้วก็ได้[1-2]

หลักเกณฑ์ในการทำ calibration มีดังนี้

1. ต้องใช้ calibrated standard plasma ที่รู้ค่า coagulation factors ต่างๆ แล้ว เช่น WHO International Standard หรือ commercial calibrated standard ในการทดสอบเพื่อหาค่า coagulation factors ของ home-made PNP โดยทำการทดสอบ 2 วัน การทดสอบแต่ละวันจะใช้ standard plasma 1 ขวด และ PNP ที่เตรียมขึ้นจำนวน 4 หลอด
2. วันที่ 1 จะทำการทดสอบ factor assays ตามขั้นตอนที่ระบุในหนังสือ “การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยโรคฮีโมฟีเลียและเลือดออกผิดปกติ”[5] เพื่อหาปริมาณ coagulation factors ที่ต้องการทราบค่า โดยมีลำดับการทดสอบ ดังนี้ IS, PNP, PNP, PNP, PNP, IS ทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งโดยใช้ diluted plasma ของแต่ละหลอด
3. วันที่ 2 จะทำการทดสอบ factor assays เช่นเดิม โดยเรียงลำดับการทดสอบใหม่ ดังนี้ PNP, PNP, IS, IS, PNP, PNP และทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งโดยใช้ diluted plasma ของแต่ละหลอด
4. คำนวณหาค่า coagulation factors ของ home-made PNP แต่ละหลอดโดยเทียบกับค่าเฉลี่ยของ IS ในแต่ละวัน
5. ค่า potency หรือปริมาณ coagulation factors ของ PNP ที่เตรียมได้จะเท่ากับค่าเฉลี่ยของ home-made PNP ทั้ง 16 การทดสอบ (4 aliquots x 2 dilutions x 2 day)

<u>หมายเหตุ</u>

- ปัจจุบันยังไม่มี standard calibrator สำหรับ FXII จึงอนุโลมให้คิดค่า potency จาก PNP เป็น 1.0 U/ml
- ควรเตรียม PNP ใหม่ทุก 12-18 เดือน ยกเว้นผล internal quality control แสดงให้เห็นว่า stability ของ PNP ชุดนั้นยังดีอยู่

เอกสารอ้างอิง

1. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. Diagnosis of hemophilia and other bleeding disorders: A laboratory manual. 2nd ed. Montreal: World Federation of Hemophilia, 2010. 22-3.
2. Meijer P, Verbruggen HW, Spannagl M. Clotting factors and inhibitors: Assays and interpretation. In: Kottke-Marchant K, Davis BH. Laboratory hematology practice. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012. 435-46.
3. Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. World Health Organization: WHO Technical Report Series, No.889, 1999: 64-93.
4. เบญจพร อัคควัฒน์. บทความฟื้นวิชา Laboratory diagnosis of lupus anticoagulant: From guidelines 1995 to 2009. วารสารโลหิต-วิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554; 21(1): 41-6.
5. ศศิธร เพชรจันทร, นิศารัตน์ โอภาสเกียรติกุล, วนิดา วงศ์ถิรพร. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยโรคฮีโมฟีเลียและเลือดออกผิดปกติ. กรุงเทพมหานคร: ชัยเจริญ, 2553. 77-85.