วิธีปฏิบัติ (Work instruction)

ชื่อเอกสาร .....การตรวจวิเคราะห์..Prothrombin..time.....

รหัสเอกสาร .....WI-LAB-H003.....

ผู้จัดทำ..... (.....นายกฤษเวท.....แซ่ท้าว.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่จัดทำ**.....5..มกราคม..2569.....
ผู้ทบทวน..... (.....น.ส..จิราพร.....ใจชื่น.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่ทบทวน**.....5..มกราคม..2569.....
ผู้อนุมัติ..... (.....น.ส..จิราพร.....ใจชื่น.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่อนุมัติ**.....6..มกราคม..2569.....
สำเนาฉบับที่.....01.....	**ผู้ถือครอง**.....เทคนิคการแพทย์.....
แก้ไขครั้งที่.....00.....	**วันที่เริ่มใช้**.....2..ตุลาคม..2558.....
แก้ไขครั้งที่.....01.....	**วันที่เริ่มใช้**.....2..มกราคม..2566.....
แก้ไขครั้งที่.....02.....	**วันที่เริ่มใช้**.....6..มกราคม..2569.....
แก้ไขครั้งที่.....	**วันที่เริ่มใช้**.....
แก้ไขครั้งที่.....	**วันที่เริ่มใช้**.....

รายการทบทวนและแก้ไข

แก้ไขครั้งที่	วันที่	รายละเอียดการแก้ไข
00	1 ตุลาคม 2558	- เริ่มจัดทำ
00	2 ตุลาคม 2558	- ประกาศใช้
01	1 มกราคม 2566	- ทบทวนเอกสาร
01	2 มกราคม 2566	- ประกาศใช้
02	5 มกราคม 2569	- ทบทวนเอกสาร
02	6 มกราคม 2569	- ประกาศใช้

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 3 ของ 15
เรื่อง : : การตรวจวิเคราะห์ Prothrombin time	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-H003	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

1.ความมุ่งหมาย (Purpose)

เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานในการตรวจวิเคราะห์ Prothrombin time โดยเครื่อง Stago Start Max® ให้ปฏิบัติงานให้มีคุณภาพและมาตรฐานเดียวกัน ได้อย่างถูกต้อง

2.การนำไปใช้ (Application)

2.1 เพื่อตรวจหาสาเหตุของเลือดออกง่าย หรือมีจ้ำเลือด

2.2 ประเมินความผิดปกติในระบบการแข็งตัวของเลือดใน extrinsic และ common pathway ได้แก่ factor X,VII, V, II, fibrinogen

2.3 ผู้ป่วยที่ได้รับยากันเลือดแข็งชนิดรับประทาน warfarin

2.4 ประเมิน synthetic function ของตับ

2.5 เป็นการทดสอบเพื่อนำผลไปควบคุมการรักษาที่ให้ยาต้านการแข็งตัวของเลือด ซึ่งออกฤทธิ์เป็นสารต้านวิตามิน K

3.เอกสารอ้างอิง (Reference)

3.1 คู่มือการใช้งานเครื่อง Stago Start Max®

3.2 คู่มือเอกสารใบแนบน้ำยา Prothrombin time

4.นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

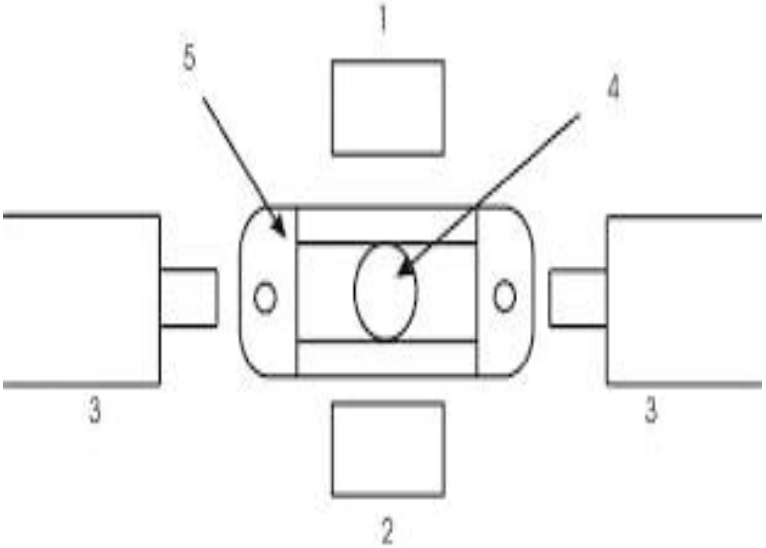
Prothrombin time เป็นการทดสอบคัดกรองปัจจัยการแข็งตัวของเลือดโดยรวม ได้แก่ Factor II, V, VII, X และ I

Prothrombin time คำย่อ PT

5.หลักการ (Principle)

การทดสอบประกอบด้วยการใช้ Calcium thromboplastin เพื่อวัดระยะเวลาการแข็งตัวของพลาสมาของผู้ป่วยและเปรียบเทียบกับเวลามาตรฐานปกติ การวัดการทดสอบโดยรวมของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ factor II, factor V, factor VII, factor X และ factor I

หลักการประกอบด้วยการวัดการเปลี่ยนแปลงในแอมพลิจูดการแกว่งของลูกบอลภายในคิวเวทท์โดยใช้ electromagnetic sensors ลูกบอลมีการเคลื่อนที่เหมือนลูกตุ้ม เนื่องจากมีรางโค้งสองรางที่ด้านล่างของคิวเวทท์ และสนามแม่เหล็กไฟฟ้ากระแสสลับที่สร้างโดยขดลวดขับเคลื่อนอิสระสองตัว แอมพลิจูดของการสั่นจะคงที่เมื่อความหนืดของแอมพลิจูดของการสั่นคงที่ เมื่อความหนืดของตัวกลางที่ลูกบอลเคลื่อนที่ผ่านค่าคงที่ แอมพลิจูดของการสั่นจะลดลงเมื่อความหนืดของตัวกลางนี้เพิ่มขึ้น

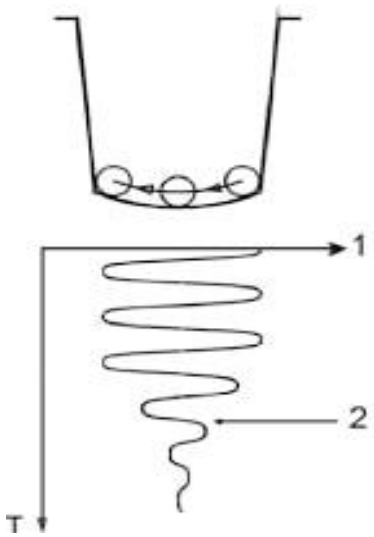


1.Emitter measurement coil
2.Receiver measurement coil
3.Drive coils
4.Ball
5.Cuvette

รูปภาพแสดง หลักการทางกายภาพของระบบการวัด

ระบบตรวจจับการเปลี่ยนแปลงแอมพลิจูดการแกว่งของลูกบอลประกอบด้วย 2 แอมพลิจูดของลูกบอล ประกอบด้วย 2 การวัดคอยล์ ขดลวดตัวปล่อยปล่อยสนามแม่เหล็กไฟฟ้าออกมา สัญญาณที่ได้รับ

จากคอยล์ตัวรับจะขึ้นอยู่กับตำแหน่งของลูกบอลภายในคิวเวทท์ อัลกอริทึมใช้การเปลี่ยนแปลงของสนามแม่เหล็กเหล่านี้ในการคำนวณแอมพลิจูดของการสั่นเพื่อกำหนดเวลาการแข็งตัวของเลือด



1.Ball oscillation amplitude

2.Coagulation

รูปภาพแสดง แอมพลิจูดของการสั่นของบอลออสซิลเลชันในระหว่างกระบวนการแข็งตัวของเลือด

6.เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated documents)

6.1 QP-LAB-001

6.2 QP-LAB-002

7.ความปลอดภัย (Safety)

7.1 ปฏิบัติงานโดยนักเทคนิคการแพทย์

7.2 สวมถุงมือ เสื้อกาวน์ (gown) แว่นตา และหน้ากากอนามัย ป้องกันการปนเปื้อนขณะปฏิบัติงาน

7.3 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอาจยังมีความสามารถในการก่อโรค ดังนั้น จึงควรจัดการทิ้งลงในถังขยะติดเชื้อ

7.4 น้ำยา Prothrombin time ใช้สำหรับตรวจวัดการแข็งตัวของเลือดทางโลหิตวิทยาเท่านั้น

7.5 น้ำยา Prothrombin time ใน R2 บรรจุ Nickel sulfate <0.1% และบรรจุ Sodium azide <1g/l จัดเป็นสารไวต่อความรู้สึกอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ต่อผิวหนัง

8.เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and Supplies)

8.1 Auto pipette 50 µl

8.2 Auto pipette 100 µl

8.3 Pipette tip yellow

8.4 เครื่อง Stago Start Max®

8.5 Cuvettes

8.6 Steel ball

9.สารมาตรฐาน (Standard)

Coag control Norm

Coag control Path

10.วิธีดำเนินการ (Procedure)

1. เปิดตัวเครื่อง Stago Start Max® (กดสวิทซ์เปิด-ปิดทางด้านข้างซ้ายของตัวเครื่อง)
2. ในหน้า Identification ให้กรอกชื่อผู้ใช้งานลงไป
3. รอให้เครื่อง Start up ประมาณ 3-5 นาที และรอประมาณ 30 นาที เพื่อให้อุณหภูมิของหลุมวัดและช่องวางน้ำยาอยู่ที่ 37°C
4. เมื่อเครื่องพร้อมใช้งาน เครื่องหมาย จะหายไป และปรากฏหน้าจอ main menu ดังแสดงด้านล่าง

การวาง reagents, cuvettes และ Steel balls

1. นำน้ำยา Neoplastin CI plus (สำหรับการทำ PT) และ $CaCl_2$ มาวางที่ ช่องวางน้ำยาที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่อง ประมาณ 30 นาที ก่อนทำ test
   กรณีที่คนไข้น้อยกว่า 20 รายต่อวัน ให้แบ่งใช้งานโดย แบ่งใส่ cup ตามปริมาตรที่ต้องการใช้ วางที่ 37°C บนเครื่อง 5 นาที ก่อนทำ test
2. วาง cuvette และ steel balls ที่ช่อง incubate อย่างน้อย 3 นาทีก่อนการใช้งาน

เตรียม Finn Pipette

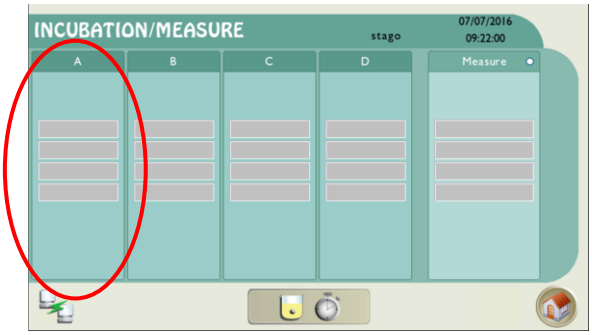
1. ควรใช้ Finn tip 1 อัน ต่อการดูด reagent หนึ่งชนิด เพื่อป้องกันการ contamination
2. ดูตารางปรับปริมาตรบน pipette ตามรูปด้านล่าง

หมุนปุ่มปรับปริมาตรไปที่	1	2	3	4	5	ขนาด Tip
ปริมาตรที่ปล่อยต่อ 1ครั้ง (µl)	50	**100**	150	**200**	250	1.25 ml

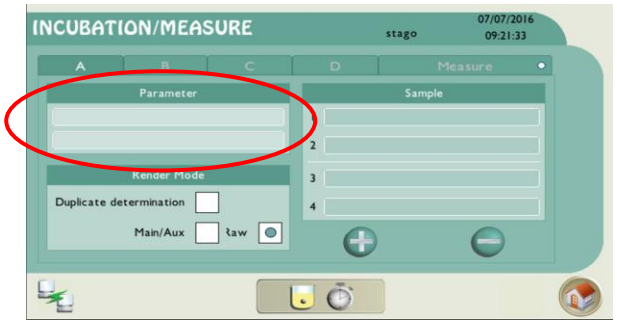
3. ดูขนาด tip ที่ใช้
4. ดูปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบ แล้วหมุนปุ่มปรับปริมาตรไปที่หมายเลข 1 หรือ 2
   เช่น ใช้ tip ขนาด 1.25 ml ทำ PT ใช้น้ำยา 100 µl ดังนั้นต้องหมุนปุ่มปรับปริมาตรไปที่ 2 ใช้ tip ขนาด 1.25 ml ทำ APTT ใช้น้ำยา 50 µl ดังนั้นต้องหมุนปุ่มปรับปริมาตรไปที่ 1
5. เมื่อดูด reagent แล้ว ให้วาง Pipette ลงใน pipette thermal conductors ที่ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อเตรียมพร้อมก่อนใช้งาน

การ Run Sample

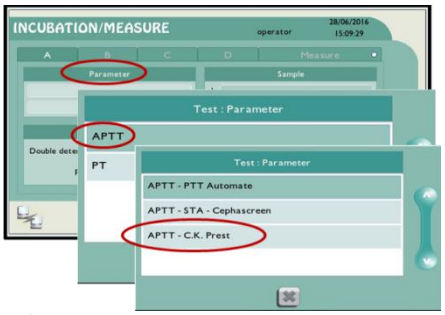
1. จาก main menu กดปุ่ม บนจอ และจะปรากฏหน้าจอตามรูปดังแสดงด้านล่าง

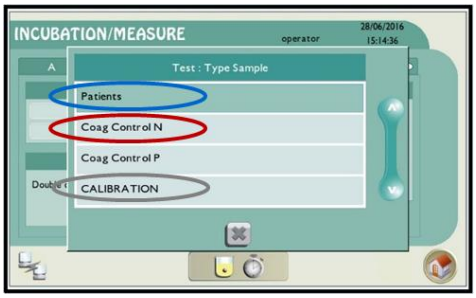


2. กดเลือก column ที่จะทำการทดสอบ แล้วหน้าจอจะแสดง ดังรูป

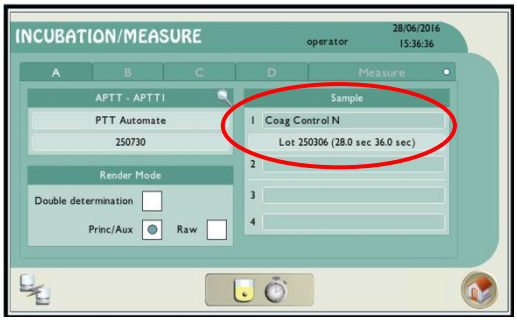


3. กดแถบว่างตรง Parameter > เลือก test ที่ต้องการทดสอบ > เลือกน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ > เลือกชนิดของการทดสอบ (sample, control, calibration) ดังตัวอย่างด้านล่าง

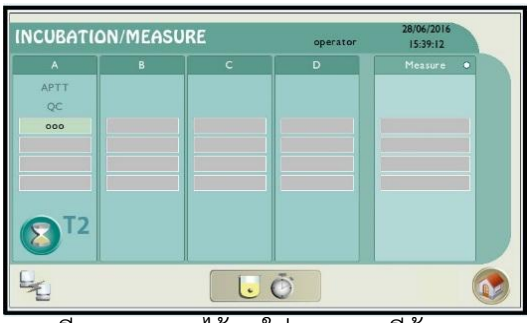




4. จากนั้นแก้ไขชื่อหรือ HN ของ sample ที่จะทำการทดสอบโดยกดที่ sample ดังรูป



5. เครื่องพร้อมทำการทดสอบ โดยกดปุ่ม แล้วเครื่องจะแสดงหน้าจอ ดังนี้



6. ใส่ steel ball ลงไปใน cuvette ที incubate ไว้ > ใส่พลาสมาที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ปริมาตร 50 µl ลงไปในหลุม > กดปุ่ม เพื่อทำการจับเวลา
7. ใช้ Finnpipette ดูดน้ำยาขึ้นลง (เพื่อ mix น้ำยา) ก่อนจะดูดขึ้นเพื่อเติมน้ำยาให้เต็ม tip
8. วาง Finnpipette ที่เติมน้ำยาแล้ว ลงในช่องเก็บ
9. เมื่อมีเสียงเตือนดังขึ้น (เครื่องจะเตือนก่อนหมดเวลา incubation ประมาณ 10 วินาที) ให้รีบเอา cuvette ย้ายใส่ลงไปในช่องวัด
10. Prime tip 1 ครั้ง (กดปล่อยน้ำยาลงในขวดหรือภาชนะที่แบ่งน้ำยาไว้) เพื่อ activate ตัว pipette
11. จะมีเวลาที่เริ่มปฏิกิริยา (sec) ปรากฏขึ้น
12. หากทำการตรวจวิเคราะห์มากกว่า 1 ตัวอย่าง ให้กดปล่อย น้ำยาที่ตัว finnpipette ลงในช่องถัดมาตามลำดับ เครื่องจะทำการวัดและแสดงผลค่า clotting time ทันทีโดยเครื่องจะเก็บผลไว้ในตัวเครื่อง ผู้ใช้งานสามารถกด เพื่อลบผลการทดสอบได้เลย

<u>ตารางสรุปปริมาตรในการ pipette</u>

Test	Incubation well	Measurement well
PT	Sample 50 µl	+ Neoplastine CI plus 100 µl
APTT	Sample 50 µl + CK Prest 50 µl	+ $CaCl_2$ 50 µl

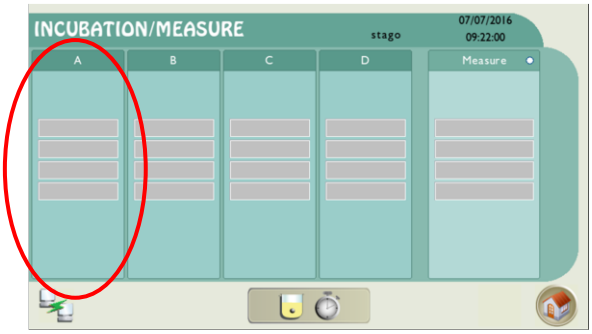
การทำ calibration

1. เตรียมน้ำยาและ calibrator
2. Run calibrator แบบ duplicate โดย run เหมือนกับ normal sample
3. นำค่าที่ได้มาเติมใน calibration โดยกดปุ่มหมายเลข 2 จากหน้า main menu

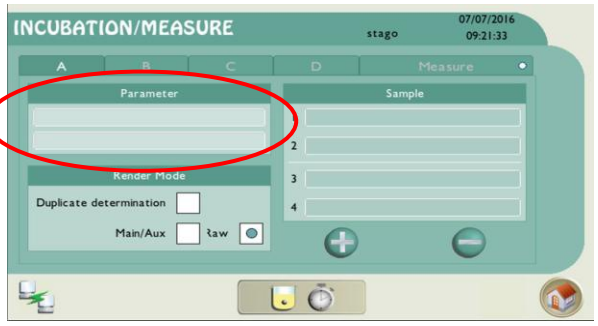
4. เติมผลที่วัดได้ เพื่อสร้าง calibration curve

การทำ Control

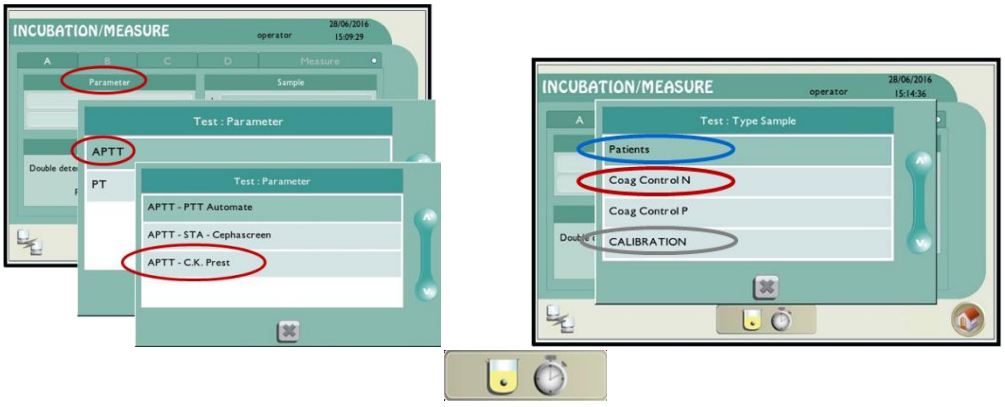
1. จาก main menu กดปุ่ม บนจอ และจะปรากฏหน้าจอตามรูปดังแสดงด้านล่าง



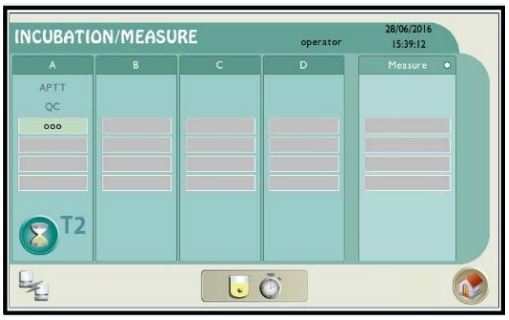
2. กดเลือก column ที่จะทำการทดสอบ แล้วหน้าจอจะแสดง ดังรูป



3. กดแถบว่างตรง Parameter > เลือก test ที่ต้องการทดสอบ > เลือกน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ > เลือกชนิดของการทดสอบ control ดังตัวอย่างด้านล่าง



4. เครื่องพร้อมทำการทดสอบ โดยกดปุ่ม แล้วเครื่องจะแสดงหน้าจอ ดังนี้



5. ใส่ steel ball ลงไปใน cuvette ที่ incubate ไว้ > ใส่ control ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ปริมาตร 50 µl ลงไปในหลุม > กดปุ่ม เพื่อทำการจับเวลา
6. ใช้ Finnpipette ดูดน้ำยาขึ้นลง (เพื่อ mix น้ำยา) ก่อนจะดูดขึ้นเพื่อเติมน้ำยาให้เต็ม tip
7. วาง Finnpipette ที่เติมน้ำยาแล้ว ลงในช่องเก็บ
8. เมื่อมีเสียงเตือนดังขึ้น (เครื่องจะเตือนก่อนหมดเวลา incubation ประมาณ 10 วินาที) ให้รีบเอา cuvette ย้ายใส่ลงไปในช่องวัด
9. Prime tip 1 ครั้ง (กดปล่อยน้ำยาลงในขวดหรือภาชนะที่แบ่งน้ำยาไว้) เพื่อ activate ตัว pipette
10. จะมีเวลาที่เริ่มปฏิกิริยา (sec) ปรากฏขึ้น
11. หากทำการตรวจวิเคราะห์มากกว่า 1 ตัวอย่าง ให้กดปล่อย น้ำยาที่ตัว finnpipette ลงในช่องถัดมาตามลำดับ เครื่องจะทำการวัดและแสดงผลค่า clotting time ทันทีโดยเครื่องจะเก็บผลไว้ในตัวเครื่อง ผู้ใช้งานสามารถกด เพื่อลบผลการทดสอบได้เลย

การบำรุงรักษา

✦ การบำรุงรักษาประจำวัน (Daily Maintenance)

- ทำความสะอาด Thermal conductor หลังจากใช้เสร็จแล้ว โดยใช้ 70% alcohol และ cotton swabs เช็ดทำความสะอาด จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด และซับด้วยกระดาษให้แห้ง ใส่กลับที่เดิม

✦การบำรุงรักษาประจำสัปดาห์ (Weekly Maintenance)

- เช็ดทำความสะอาดตัวเครื่อง และช่องวางน้ำยาโดยใช้ 70% alcohol
- ทำความสะอาด Thermal conductor ด้วยวิธีเดียวกับ daily maintenance
- ทำความสะอาดช่องวัด, incubation well และ pipette well ด้วยผ้าก๊อซและ 70% alcohol

การปิดเครื่อง

กดปิดสวิทซ์ ON/OFF ทางด้านข้างซ้ายของเครื่อง

ข้อควรระวังของน้ำยาในการทำการทดสอบ

1. ไม่ควรใช้น้ำยาเกินจาก Stability ที่กำหนด
2. ไม่ควรใช้น้ำยาที่มีการ contaminate จากน้ำยาชนิดอื่น หรือ จากพลาสมา
3. น้ำยา $CaCl_2$ หากพบว่ามีลักษณะขุ่น ควรเปลี่ยนใช้ขวดใหม่ทันที เนื่องจากอาจมีการ contaminate
4. ตรวจชนิดน้ำยาให้ถูกต้องทุกครั้ง ก่อนทำการทดสอบ ในกรณีที่มีการใส่น้ำยาสลับชนิดกัน ต้องทำการทดสอบใหม่

การทดสอบ	ความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้น	ผลการทดสอบ
PT	ใส่น้ำยาผิดชนิด คือใส่น้ำยา APTT ลงไป	Prolonged หรืออาจได้ค่า > Max time เนื่องจากในน้ำยาไม่มี $CaCl_2$
APTT	ใส่น้ำยาผิด คือ ใส่น้ำยา PT ลงไป	Error เนื่องจากมีการ clot เกิดขึ้นเรียบร้อยแล้วหลังจากใส่น้ำยา

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์ การทดสอบ PT, APTT และวิธีการแก้ไขปัญหาเบื้องต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์	ผลการทดสอบ	วิธีการแก้ไข
เจาะเลือดได้ต่ำกว่าปริมาตร	Prolongs times	เจาะเก็บสิ่งตัวอย่างใหม่
เจาะเลือดได้สูงกว่าปริมาตร	Shortens times	เจาะเก็บสิ่งตัวอย่างใหม่
สิ่งตัวอย่าง clot (Large clot)	Prolongs times	เจาะเก็บสิ่งตัวอย่างใหม่

มี Heparin ปนเปื้อนระหว่างเจาะ	Prolongs times	เจาะเก็บสิ่งตัวอย่างใหม่
ค่า Hematocrit มากกว่า 55%	Prolongs times	เจาะเก็บสิ่งตัวอย่างใหม่ โดยปรับปริมาตรสารกันเลือดแข็งให้น้อยลง
อุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินไป	Prolongs times	แจ้งช่างเพื่อเข้าซ่อมแซมเครื่องมือตรวจวิเคราะห์
สิ่งตัวอย่าง clot (small clot)	Shortens times	เจาะเก็บสิ่งตัวอย่างใหม่
Hemolysis/เม็ดเลือดแตกขณะเจาะ	ค่า APTT สั้น	เจาะเก็บสิ่งตัวอย่างใหม่
ผลคอนโทรลไม่อยู่ในช่วง	-	1. ตรวจสอบประสิทธิภาพของน้ำยา หรือคอนโทรลที่ใช้ในการทดสอบ 2. หาสาเหตุและดำเนินการแก้ไขก่อนออกผลการทดสอบคนไข้
ผล PT หรือ APTT มากกว่าค่า maximum time	-	1. ตรวจสอบสิ่งตัวอย่าง ดู clot 2. ตรวจสอบความผิดปกติขณะเจาะ 3. เปรียบเทียบกับผลการทดสอบในครั้งก่อน 4. แจ้งค่าวิกฤติให้แพทย์หลังจากที่มีการตรวจสอบหาสาเหตุแล้ว

ที่มา: CLS416Clinical Hematology l Rot l Coag Unit Coag Instruments Handout

11.การคำนวณ (Calculation)

$$\text{INR} = \left(\frac{\textbf{Pateint PT}}{\textbf{Mean Normal PT}}\right)^{\text{ISI}}$$

12.การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

การควบคุมคุณภาพภายใน

- ทำ IQC ทุกครั้งที่มีรายการสั่งตรวจรายการแรกของวันนั้น ใช้สารควบคุมภาพที่มีค่า PT ซึ่งแนะนำให้ใช้

Coag control Norm

Coag control Path

การควบคุมคุณภาพภายนอก

-เข้าร่วมโครงการทดสอบประเมินคุณภาพโดยองค์กรภายนอกสำหรับการทดสอบการแข็งตัวของเลือด ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ปีละ 3 ครั้ง

13.การบันทึกข้อมูลและเอกสารที่ใช้ (Data record and documentation)

บันทึกลงใน F-LAB-02.H008 และลงในระบบ LIS ของห้องปฏิบัติการ โดยระบบจะเชื่อมต่อเข้าสู่ระบบ HIS อัตโนมัติ

14. การรายงานผล (Report of analysis)

ค่า PT ปกติ 11.2 - 16.5 วินาที

ค่า INR 2-4

15.รายละเอียดอื่น (Supplementary note)

15.1 สิ่งส่งตรวจ 3.2 % Trisodium citrate blood

15.2 การรักษาคงสภาพของสิ่งส่งตรวจ รีบนำส่งตรวจทันที

15.3 สิ่งรบกวน

15.3.1 เจาะเลือดปริมาตรไม่เหมาะสม

15.3.2 สิ่งส่งตรวจที่ปนเปื้อน heparin ความเข้มข้นมากกว่า 0.6 U/mL อาจทำให้ผลที่ได้ผิดปกติ

15.3.4 inhibitors ในกลุ่ม Lupus anticoagulant มีผลต่อการตรวจวัด Prothrombin time

15.3.5 สิ่งส่งตรวจที่ hemolysis , Lipemic , Icteric , parenteral feeding (คนไข้ที่ให้อาหารทาง หลอดเลือด) มีผลรบกวนการตรวจวิเคราะห์

15.3.6 คนไข้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาในกลุ่ม Lipoglycopeptide antibacterial drugs อาจมีผลรบกวน การตรวจ PT

15.3.7 Hirudin หรือ ยาในกลุ่ม Direct thrombin inhibitors ที่ระดับการรักษา (therapeutic dose) อาจส่งผลให้ค่า Prothrombin time ที่ตรวจวัดได้มีค่า Prolong

15.3.8 คนไข้ที่มีภาวะ Dysfibrinogenemia

15.3.9 สารที่ใช้เพิ่มปริมาตรเลือด ได้แก่ Hydroxyethyl starch (HES) solution มีผลรบกวนการตรวจวิเคราะห์

15.3.10 คนไข้ที่มีค่า Hematocrit > 55 % (จะต้องมีการคำนวณเพื่อลดปริมาณสารกันเลือดแข็ง)

15.3.11 คนไข้ที่ได้รับการรักษาด้วย Estrogen therapy