

**ครั้งที่ 4 ประจำ พฤษภาคม 2552**

**คำถาม** แก้ปัญหาตัวอย่างผิดปกติ ทำให้ผลตรวจมี Error ( ต่อจาก วิชาการ 1 นาที ครั้งที่ 3 )

**QC ของ Serum Sample ปัญหา Icteric และ Lipemic**

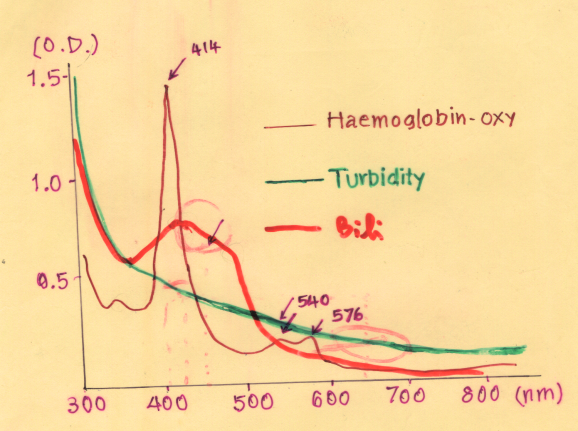
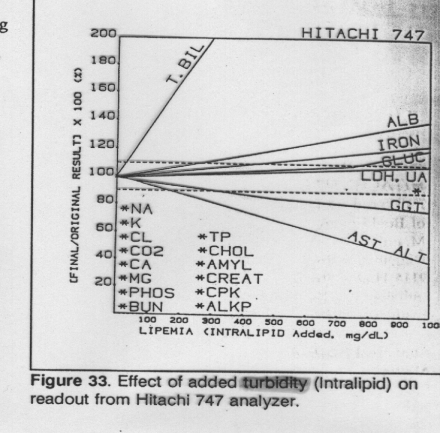
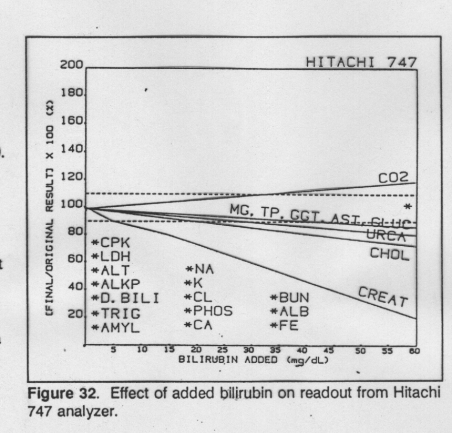
**ตอบ** โดย อมรินทร์ ปรีชาวุฒิ

ตัวอย่าง **ซีรั่ม ที่ผิดปกติ** เมื่อสังเกตุเห็นชัดด้วยตา มีสีเหลืองเขียวจากน้ำดี **Icteric** (มาจากบิลลิรูบินมากกว่า 1.0 mg/dL) ขุ่นขาว ๆ **Turbid** (ขุ่น เพราะมีการดูดซึมไขมันจากอาหารที่เพิ่งรับประทาน จาก lipoprotein ความหนาแน่นต่ำมาก จากค่าTG สูงมากๆ ) มี **hemolysis** เห็นซีรั่มเป็นสีแดง **บทความในครังนี้จะแก้ปัญหาเฉพาะ Icteric และ Turbidity และกล่าวถึงการรบกวนโดย Icteric และ Turbidity เท่านั้น** ( โปรดอ่านเรื่องปัญหา Hemolysis ในวิชาการ 1 นาที ครั้งที่ 3)

**Optical interference เกิดขึ้นเมื่อ** **ซีรั่มผิดปกติ**

ในหนังสือเคมีคลินิคกล่าวถึงรบกวนผลการตรวจจาก**ซีรั่มผิดปกติ** ทุกเล่มในเทคนิคหลักการวิธี Colorimetric ที่วัดค่าการดูดแสงของสารสีที่วัดด้วย spectrophotometry ในช่วง visible range 400 – 600 นาโนเมตร เพราะความขุ่นบังหลบแสงเหมือนกระจกฝ้าบังแสงแดด สแกนค่าดูดแสงเห็นได้ตลอดช่วงการวัด และ สาร bile หรือบิลลิรูบิน ดูดแสงซึ่งสแกนค่าดูดแสงเห็นได้เช่นกัน (ดูภาพ 1) ดังนั้นถ้าใช้น้ำเปล่าตั้งค่าที่ Zero absorbance แล้วไปเปต**ซีรั่มผิดปกติ** ลงในหลอดทดลองวัดค่า จะอ่านค่าได้สูงกว่า 0 Abs. เสมือนมีสารชีวเคมีที่เรากำลังตรวจอยู่จำนวนหนึ่งไม่มากก็น้อย ( เสมือนมีน้ำตาล มีกรดยูริค ที่ 500nm. มีโปรตีน ที่ 540 nm. หรือ มีสารพัดสารในช่วง nm. ต่างๆ ) และเป็นเหตุของ error ที่เราจัดอยู่ในกลุ่ม **Interferences** (ดูภาพ 2 และ 3)

การรบกวนอีกแบบหนึ่งคือการรบกวนทางการยับยั้งหรือเสริมปฏิกิริยาเคมี (reaction) โดยไขมันและบิลลิรูบินนั้นเอง เช่น บิลลิรูบินเป็นสาร oxidizing agent รบกวนปฏิกิริยา Reduction ของ สารที่ต้องการตรวจกับน้ำยา reagent เกิดผล false -ve

ภาพ 1 ภาพ 2 ภาพ 3

ใน ภาพ 2 และ 3 ที่เส้นกราฟ 100 แสดงการไม่มี error แต่ ที่เส้นกราฟเกิน 100 แสดงการรบกวนมีผลค่าสูงเกินจริงเป็น false +ve และที่เส้นกราฟใต้ แสดงการรบกวนมีผลให้ค่าต่ำกว่าจริงเป็น false –ve

**แนวทางปฏิบัติการแก้ไข**

ในหลักการวัด Colorimetric ด้วยเครื่อง VIS Spectrophotometer เราใช้น้ำกลั่น ตั้งค่าตั้งต้นที่ 100.0%T หรือ Abs 0.000 OD และถ้าน้ำยามีสี เช่น น้ำยาBiuret สีน้ำเงิน, น้ำยาBCG สีแหลืองอมเขียว, น้ำยา GOD เก่าเก็บมีสีชมพู เป็นต้น รบกวนให้ค่าตั้งต้นเปลี่ยนค่า Abs (ไม่ใช่ Abs 0.000 OD ) จะต้องแก้ไขค่ารบกวนโดยทำ **Reagent Blank**

ทำนองเดียวกัน Sample ที่มีลักษณะผิดปกติต้องแก้ไข correct ค่าโดย ทำ **Sample Blank** ด้วย เมื่อวัดค่าน้ำยาที่ผสมตัวอย่างซีรั่มในหลอดทดลอง เราจะได้ค่า **Total Abs** ซึ่งส่วนมากเป็น Absของสารเกิดสีจากปฏิกิริยาตรวจจับสารที่วัด(ที่ไม่ใสเหมือนน้ำกลั่น หากเป็นการยับยั้งปฏิกิริยาอาจมีผลทางลบ) บวกกับ Absส่วนน้อยๆของสารสีในน้ำยา Reagent (ที่ไม่ใสเหมือนน้ำกลั่น) และบวกกับ Abs ส่วนน้อยๆของตัวอย่างซีรั่มที่ผิดปกติ (ที่ไม่ใสเหมือนน้ำกลั่น) อาจบวก Abs ของสีอื่นๆปลอมปน เช่นสีของยาที่รับประทานและดูดซึมอยู่ในกระแสเลือด ( ถ้ามี )

**วิธีทำ Sample Blank** เพื่อแก้ปัญหา Inaccuracy

มีวิธีทำ sample blank หลายวิธี ได้แก่

**1**. **ตกตะกอนโปรตีน**ในตัวอย่าง **Protein-free Filtrate** และ **Protein-free Centrifugate**

1.1 ตกตะกอนโปรตีน ด้วยกรด เช่น กรด TCA ( Trichloroacetic acid ), กรด Tungstic acid (วิธี Folin Wu )

* 1. ตกตะกอนโปรตีน ด้วยโลหะหนัก เช่น Barium hydroxide (วิธี Somogi Nelson )

เหตุผลคือ สารรบกวนในตัวอย่างเลือดเป็นโปรตีน กล่าวคือ ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีน บิลลิรูบินจับอยู่กับอัลบิวมิน และไขมันหรือไลปิดจับกับโปรตีนเป็น lipoprotein เมื่อตกตะกอนโปรตีนก็จะพาสารสีอย่าง ฮีม Heme บิลลิรูบิน และไขมันเบาร่วมตกตะกอนไปด้วย และเมื่อนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง filter paper หรือนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge เอาตะกอนออกจะได้น้ำกรอง **filtrate** หรือน้ำจากการปั่น **centrifilgate** ที่มีสีใสเหมือนน้ำกลั่น ซึ่งวัดค่า Abs ได้น้อยมากหรือไม่ได้เลย สามารถนำไปเป็นตัวอย่าง sample ตรวจสารชีวเคมี ต่างๆ เช่น กลูโคส ครีอะตินีน ยูเรีย ยูริคเอซิด แต่วิธีการทำมีขั้นตอนยุ่งยาก ปฏิบัติกันในอดีต และไม่นิยมใช้ในปัจจุบัน โดยเฉพาะมีปัญหาอุปสรรคเมื่อต้องการใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Automation

**2**. **Bichromatic** **Reading** คือวัด Abs ที่ความยาวคลื่นสองจุด หรือ หลายๆจุด เรียกว่า **Bichromatic** ( bi = สอง, chroma = สี )และ **Polychromatic** ( poly = หลายๆ )

นอกจากเจาะจงวัด Abs ที่จุดความยาวคลื่น wavelength ประจำสารสีจากปฏิกิริยาเป็นปกติแล้วได้ค่า total absorbance ต่อจากนั้น มีการสแกนหาแหล่งคลื่นที่เป็น Abs ของสารรบกวนของ sample แล้วกำหนดจุดเพื่อวัดค่า Abs ของสารรบกวน เป็นค่าที่นำมาหักลบจาก total Abs

วิธีนี้ถูกพัฒนามาใช้อยู่ในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Fully Automate ที่ทันสมัยในปัจจุบัน เช่น Hitachi, Olympus , Becman, Dade. Wako, Cobas Integra, Abbott Architech, ABX Penta … เป็นต้น เรายังอาจพบในเครื่อง Semi Automate บางเครื่องเท่านั้น ( ให้ตรวจ Mode การวัดของเครื่อง )

ในการทำแล็บด้วยมือ manual work โดยใช้ VIS spectrophotometer แบบตั้งโต๊ะรุ่นเก่า เราติดตามวิธีทำใน test direct sheet ที่มาในกล่อง Reagent Kit มักไม่แสดงวิธีการวัด Bichromatic คือไม่แสดง wavelength ที่สอง จึงมีผล systemic error ได้ แนะนำผู้ทำ manual ต้องทำรายงานในใบแสดงผลว่า ตัวอย่างมีความผิดปกติเมื่อสังเกตได้ด้วยตาว่ามี ( hemolysis, Icteric, Turbid ) มากน้อยเพียงใด เพื่อให้แพทย์ที่ใช้ผลตรวจประเมินความผิดพลาดได้เมื่อพบว่าผลไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย ในการทำแล็บด้วยมือ manual work ผู้ทำเรียนรู้การ set Zero ด้วยน้ำกลั่นก่อน แล้วต่อมานำ Reagent มา set Abs ที่ Zero ซ้ำอีก ครั้งนี้แหละ ชี้ว่าท่านได้ทำ Reagent Blank ด้วยมือแล้ว ( แทนสมการ การหักลบในวิธีคำนวณแบบเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ )

1. **วัดค่า Abs ที่ wavelength เดียว สองจุดต่างของเวลา**ในช่วงห่างปฏิกิริยาเคมี นิยมเรียก Modeการวัดเป็นแบบ **Two**

**Points** หรือ Delta A =  A ( ค่า total Abs1 หักลบกับ total Abs2 ) นำค่าที่วัดได้ 2 ครั้งมาหักลบกัน ได้ผลลัพท์เป็นค่า เดลต้าเอ  A ( delta absorbance ) อธิบายการหักลบค่าสารรบกวนของตัวอย่างที่ผิดปกติดังนี้

สมมติ วัดค่าที่ ความยาวคลื่น ให้ค่าวัดสี reagent เป็น R ให้ค่ารบกวนของ sample เป็น S และค่าวัด**จุดเวลาแรก** เป็น **A 1** ( total Abs1 ) และ ค่าวัด**จุดเวลาที่สอง** เป็น **A 2** ( total Abs2 )

 A = ( total Abs2 - total Abs1 )

= ( A 2 + R+S ) – ( A 1 + R +S)

เปิดวงเล็บ = ( A 2 – A 1 ) ผลแสดงค่าที่ปราศจากการรบกวน ค่า R และ S

 A Sample

คำนวณสุดท้าย ผล Conc. of Sample = ------------------- x Conc of Standard

 A Standard

ทำนองเดียวกันกับการวิธีการวัดแบบอัตราเร็วหรือ Rate ของปฏิกิริยาเอนไซม์ **Enzyme Kinetic Rate** ที่วัดแบบ **Two Points**

และมีการวัดสองครั้ง (ใช้ความยาวคลื่นเดียว ) และหาค่า  A แต่มีการคำนวณหาค่า **Activity ของปฏิกิริยา**

**เอนไซม์-ซับสเตรท** ตามเกณฑ์กำหนดนิยามของหน่วยวัดสากล International unit หรือ IU / L ( ไม่ต้องการ Standard )

 A /นาที x TV x 1000

IU/L = -----------------------------------

w X SV x LP

w = molecular extinction coefficient ( สัมประสิทธิ์แสดงค่า**ปริมาณจำเพาะ**ของโมเลกุลสารที่ตรวจ ใช้ตรวจจับที่ความยาวคลื่นดูดแสงเฉพาะตัว เช่น NADH ที่ 340 nm. ค่าmillimolar absorbtivity w = **6.3** x **10**3

TV = Total Volume ปริมาตรรวมในหลอดทดลองของ Reagent + Sample

SV = Sample Volume ปริมาตรของ Sample ( มีหน่วยเดียวกันกับ TV )

LP = light-path ความยาวทางแสงผ่านสารที่คิวเวท หน่วยเป็นเซนติเมตร

**4**. **Two-tube Method** หรือวิธีวัดหลอดทดลอง 2 หลอด คือหลอดแรกมีน้ำยาที่ขาดสารเคมีตัวสำคัญตัวหนึ่งที่มีส่วนทำให้เกิดสี ไปเปตตัวอย่างลงไปผสมให้เข้ากัน หลอดนี้ไม่เกิดสีจากปฏิกิริยาเคมี แต่อามีสีเหลืองปนเขียว หรือความขุ่นที่มาจาก sample นั้นๆที่ถูกเจือจาง บางที่เราเรียกหลอดนี้ว่า Blank tube สมมติวัดค่า Abs = A1 ( ก่อนวัดใส่หลอดน้ำกลั่น ตั้ง Abs ที่ Zero ) ส่วนอีกหลอดเป็นหลอดที่สอง มีน้ำยาปกติที่มีสารเคมีผสมครบ แล้วเราไปเปต ดูดตัวอย่างลงไปผสมให้เข้ากัน หลอดนี้จะเกิดสีจากปฏิกิริยาเคมีที่เราต้องการ เราเรียกหลอดนี้ว่า Reaction tube สมมติวัดค่า Abs = A2 สุดท้าย นำค่าหักลบกัน ได้  A มีหลักคิดการ Blanking เหมือนข้อ 3 วิธีนี้ยังพบในเครื่องมืออัตโนมัติรุ่นเก่า ซึ่งเครื่องมืออัตโนมัติใหม่ๆที่ทันสมัยไม่ใช้วิธีนี้แล้ว

1. **เขียน แฟคเตอร์ หรือ เขียนโปรแกรม แก้ไขค่าฝังไว้ในเครื่องหรือใน Test Parameter** เช่นมีผลของสมการ

เปรียบเทียบวิธีที่ใช้ตรวจกับวิธีอ้างอิง **Method Correlation Comparison** คำนวณแปลงค่าฝังอยู่ในเครื่องวิเคราะห์ Analyser ค่าโปรแกรมของเครื่อง ( คำนวณแก้ไข error ด้วยตัวแปร Intercept และ Slope ) ตัวอย่างเครื่องอัตโนมัติที่ฝังสมการสหสัมพันธ์วิธี Method Correlation Equation เช่น แปลงค่า ผลฮีโมโกลบินเอวันซี **IFCC**เป็นค่า ผลฮีโมโกลบินเอวันซี **NGSP**ในใบพิมพ์ผล Request Form , แปลงค่า ผล Electrolytes **Direct ISE** เป็นค่า ผล Electrolytes **Indirect ISE** ในใบพิมพ์ผล Request Form โดยที่เจ้าหน้าที่แล็บไม่ต้องลงแรงทำเอง ( แต่เราต้องรู้ เพราะเรื่องหลักการเทคนิควิธีและความรับผิดชอบเป็นของเรา บริษัทไม่มารับผิดชอบกับเรา บางทีบริษัทอาจไม่รู้และไม่ตอบให้เรากระจ่าง หรืออาจตอบผิดๆ )

**การทำ Sample Blank เป็นแนวทางนำไปสู่คุณภาพ เพิ่ม ACCURACY และลดค่า %bias ที่สำคัญมาก ๆ ( เป็นหนึ่งในคำตอบของคำถาม เหตุใดแล็บจึงพลาด เกรด A ??? ) ผมอยากให้แล็บสำรวจการทำงานในแต่ละ test ของท่าน ว่ามีการทำ sample blank หรือไม่ ??? และเป็นวิธีใดกันแน่ ???**

References : International Recognition

1. Organizers of NEQAS in Clinical Chemistry in Country of South-East Asia of WHO. Ref. QA Newsletter on

Quality Assurance in Health Laboratory Services. Vol.1 No.2 January 1999.

1. EQA provider of pSMILE 2006. Patient Safety Monitoring & International Laboratory Evaluation, Laboratories

to Participate in the National Institute of Health ( NIH ) – DAID. USA. Ref. <http://www.pSMILE.org>