



แผนกพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง

การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)

WI-LAB-019

แก้ไขครั้งที่ 2

ผู้จัดทำ

(นายสิปพนธ์ ศรีวะรมย์)

ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิก

1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้ทบทวน ร.ท.หญิง

(อรกัญญา ทรงทอง)

ผู้จัดการคุณภาพ

1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้อนุมัติ พ.อ.

(ฉัตรมงคล คนขยัน)

หัวหน้าห้องปฏิบัติการ

1 กุมภาพันธ์ 2566

วันที่ประกาศใช้: 1 กุมภาพันธ์ 2566

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณณสีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 1 จาก 18 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

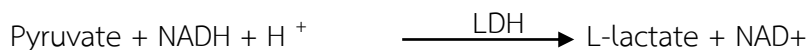
1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ(purpose of examination)

- 1.1 เพื่อตรวจเชิงปริมาณวิเคราะห์หาระดับ catalytic activity concentration ของเอนไซม์ Alanine Aminotransferase (ALT) ใน serum และ plasma ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ cobas c 501 ร่วมกับน้ำยา Alanine Aminotransferase acc. to IFCC with pyridoxal phosphate activation (ALTLP Cat. No. 04467388 190)
- 1.2 เพื่อช่วยชี้บ่งโรคเกี่ยวกับตับ เมื่อพบว่าผู้ป่วยมีอาการที่สงสัยว่าจะเป็นโรคตับ เช่น ตัวเหลือง ตาเหลือง ปัสสาวะสีเข้ม คลื่นไส้ อาเจียน ปวดบริเวณส่วนบนขวาของช่องท้อง เป็นต้น โดยนิยมส่งตรวจคู่กับ AST เพื่อใช้คำนวณหาอัตราส่วนของ ALT/AST (DeRiTis ratio) พร้อมกับระดับเอนไซม์อื่นๆ ที่ผลิตจากตับ
- 1.3 เพื่อตรวจติดตามและดูแลการตอบสนองต่อการรักษาโรคเกี่ยวกับตับและโรคที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ

2. หลักการและวิธีการของขั้นตอนที่ใช้สำหรับการทดสอบ (principle and method of procedure used for examinations)

- 2.1 หลักการ (Principle) : น้ำยา ALTLP ใช้หลักการตามคำแนะนำของ The International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), แต่มีการปรับปรุงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความเสถียร

ALT ในตัวอย่างเร่งปฏิกิริยาระหว่าง L-alanine และ 2-oxoglutarate ได้เป็น Pyruvate จากนั้นจะถูกรีดิวซ์โดย NADH ในปฏิกิริยาโดยมี Lactate dehydrogenase (LDH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็น L-Lactate และ NAD⁺, Pyridoxal phosphate จะ ถูกใช้ เป็น coenzyme ใน amino transfer reaction ทำให้เกิด enzyme activation อย่างเต็มรูปแบบ



อัตราการเกิดออกซิเดชันของ NADH เป็นสัดส่วนโดยตรงกับ catalytic ALT activity ในตัวอย่างตรวจ ซึ่งวัดได้จากการดูดกลืนแสงที่ลดลง จึงสามารถนำไปคำนวณหา catalytic activity concentration ในตัวอย่างตรวจของ ALT ได้

- 2.2 วิธีการ(method) : ใช้วิธี UV with P5P-IFCC Ref. Proc., Calibrated

Traceability: This method has been standardized against the original IFCC formulation using calibrated pipettes together with a manual photometer providing absolute values and the substrate-specific absorptivity.

The addition of pyridoxal phosphate to the assay causes an increase in aminotransferase activity. Pyridoxal phosphate activation prevents falsely low aminotransferase activity in patient samples with insufficient endogenous pyridoxal phosphate (vitamin B6 deficiency).

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวระ	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 2 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

3. ลักษณะทางประสิทธิภาพ (performance characteristics)

ระบุไว้ในใบแทรกนํ้ายา ALTLP Alanine Aminotransferase acc. to IFCC with pyridoxal phosphate activation (PI-LAB-019) ดังนี้

3.1 คุณลักษณะด้านความแม่นยำ(Precision) : เป็นการตรวจสอบความแม่นยำโดยใช้ตัวอย่างตรวจจากมนุษย์และสารควบคุมคุณภาพ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง cobas c 501 ร่วมกับนํ้ายา ALTLP โดยใช้วิธีการตรวจซ้ำแบบ within-run precision หรือ repeatability (n=21) และแบบ between-run precision หรือ intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 20 days).ได้ผลดังนี้

Repeatability	Mean	SD	CV	CV _A	ผลการตรวจสอบ
(n=21)	U/L	U/L	%	%	
Precinorm U	39.5	0.3	0.6	≤3.75	PASS
Precipath U	120	0	0.4	≤3.75	PASS
Human serum 1	113	0.5	0.4	≤3.75	PASS
Human serum 2	7.2	0.7	9.3	≤3.75	PASS
Intermediate precision	Mean	SD	CV	CV _A	ผลการตรวจสอบ
(3 aliquots per run, 1 run per day, 20 days)	U/L	U/L	%	%	
Precinorm U	39.3	0.6	1.4	≤5	PASS
Precipath U	120	1	1.0	≤5	PASS
Human serum 3	24.0	0.6	2.6	≤5	PASS
Human serum 4	121	2	3.3	≤5	PASS

3.2 คุณลักษณะเมื่อเปรียบเทียบวิธีการทดสอบ (Method comparison)

ALT values for human serum and plasma samples obtained on a Roche/Hitachi cobas c 501 analyzer (y) were compared with those determined using the corresponding reagent on a Roche/Hitachi 917 analyzer (x).

Sample size (n) = 198

Passing/Bablok : $y = 1.000x - 0.438$ U/L, T = 0.931

Linear regression : $y = 0.994x - 1.72$ U/L, r = 0.995, ผ่าน (PASS)

The sample activities were between 5.10 and 469 U/L

- เกณฑ์การยอมรับ inaccuracy จากการทำ method comparison ของ ALT
 - Correlation coefficient (r): $r > 0.975$
 - มีหลักฐานแสดง bias ของการตรวจวิเคราะห์ ALT โดยใช้เกณฑ์การยอมรับ Bias ≤6.75%
- ผลการตรวจสอบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับ method comparison
 - ค่า Bias เทียบกับเกณฑ์ ณ ค่า Medical decision level ของ ALT: ผ่าน (PASS)

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 3 จาก 18 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

- ค่า r เทียบกับเกณฑ์ แล้วมากกว่า 0.975: ผ่าน (PASS)

4. ชนิดตัวอย่าง (type of sample)


- 4.1 ตัวอย่างเริ่มต้น (primary sample) ได้แก่ เลือด(Blood) ปริมาณที่ต้องการสำหรับหลอดเก็บเลือดขนาด 13x75 mm. ประมาณ 2- 4 mL ตามข้อกำหนดของแต่ละชนิดของหลอดบรรจุเลือด(ดูข้อ 6) ก่อนนำเข้าตรวจวิเคราะห์ต้องปั่นแยกให้ได้ Serum/Plasma ที่ความเร็วรอบ 3500 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที
- 4.2 ชนิดตัวอย่างที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่
 - 4.2.1 Serum
 - 4.2.2 Plasma กำหนดให้ใช้ Li-heparin and K2-EDTA plasma
- 4.3 การตรวจ ALT แต่ละครั้ง เครื่อง cobas c 501 จะใช้ Normal sample volume 9 ไมโครลิตร

5. การเตรียมผู้ป่วย (patient preparation)

- 5.1 ควรอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง เพราะถึงแม้ว่าเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดหรืออาหารที่รับประทานจะไม่มีผลกระทบต่อระดับของ ALT แต่ความชุกของไขมัน (chylomicrons) ในอาหารมีผลกระทบต่อวิธีที่ใช้วิเคราะห์ ALT
- 5.2 งดการฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อ(IM) และหยุดการใช้ยาที่กระทบต่อผลการวิเคราะห์(drug-induced liver injury) เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนเจาะเก็บตัวอย่างเลือด
- 5.3 งดเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อย่างน้อย 1 สัปดาห์ เนื่องจากพิษของแอลกอฮอล์ทำให้ตับบาดเจ็บ เซลล์ตับที่ได้รับบาดเจ็บทำให้ ALT เริ่มสูงขึ้นในเลือดเมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง จะขึ้นสูงสุดภายใน 24-36 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 3-7 วัน ค่า ALT จะกลับคืนลงมาสู่ระดับปกติ และ ในกระแสเลือด ALT มี half-life 16-18 ชั่วโมง

6. ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง (type of container and additives)

- 6.1 ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่งซึ่งใช้บรรจุตัวอย่างเริ่มต้นที่ส่งตรวจหา ALT ได้แก่
 - 6.1.1 หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด Li-Heparin Blood Collection tube (ฝาปิดหลอดสีเขียว) มี Lithium Heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ขนาดบรรจุ 3 mL ใช้ในงานประจำวัน สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดเริ่มต้นของคนไข้จากแผนกตรวจโรคผู้ป่วยนอกที่ส่งตรวจหาระดับ ALT ร่วมกับรายการทดสอบทางเคมีคลินิกอื่นๆ โดยให้เก็บตัวอย่างที่ห้องเจาะเลือดของห้องปฏิบัติการ
 - 6.1.2 หลอดบรรจุเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งซึ่งมีหรือไม่มีสารกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด เช่น Clot activator Blood Collection tube(ฝาปิดหลอดสีแดง) ขนาดบรรจุ 3-4 mL ใช้ในงานประจำวัน สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดเริ่มต้นของคนไข้ที่ส่งมาจากห้องฉุกเฉิน หอผู้ป่วยใน ห้องไตเทียม และห้องตรวจสุขภาพ
 - 6.1.3 หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA Blood Collection tube(ฝาปิดหลอดสีม่วง) มี K2-EDTA หรือ K3-EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ขนาดบรรจุ 2-3 mL ปกติจะไม่ใช้ในงานประจำวัน แต่จะใช้เฉพาะในกรณีที่ส่งตรวจ ALT แต่ไม่ได้เก็บตัวอย่างเลือดในภาชนะบรรจุตามข้อ 6.1.1 และ 6.1.2 เท่านั้น

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณณสีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 4 จาก 18 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

6.2 ประเภทของภาชนะที่ใช้บรรจุตัวอย่างนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์

- 6.2.1 หลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้นขนาด 13x75 mm. ในข้อ 6.1 ที่ปั่นแยก serum หรือ Plasma แล้ว
- 6.2.2 Hitachi cup เป็น sample cup ที่ใช้บรรจุตัวอย่างตรวจที่แบ่งมาจากหลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้น ต้องการปริมาณตัวอย่างไม่น้อยกว่า sample dead volume 100 ไมโครลิตร
- 6.2.3 Hitachi micro cup เป็น Sample cup ที่ใช้บรรจุตัวอย่างที่แบ่งมาจากหลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้น ต้องการปริมาณตัวอย่างไม่น้อยกว่า sample dead volume 50 ไมโครลิตร
- 6.2.4 หลอดชนิดไม่มีสารกันเลือดแข็ง(Plain tube) ใช้บรรจุตัวอย่างที่แบ่งมาจากหลอดบรรจุตัวอย่างเริ่มต้น ต้องการปริมาณตัวอย่างไม่น้อยกว่า sample dead volume 500 ไมโครลิตร

6.3 ความคงตัวของระดับ ALT ในภาชนะบรรจุที่มีและไม่มีสารเติมแต่ง

ชนิดตัวอย่าง	อุณหภูมิ	ความคงตัว
Serum/Plasma	15-25°C	3 วัน
	2-8°C	7 วัน
	-60 ถึง -80°C	>7 วัน

7. เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี (required equipment and reagents)

- 7.1 เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ : ใช้เครื่อง cobas c 501 ซึ่งเชื่อมต่อกับเครื่อง cobas e 601, Control unit และ Core unit เป็นระบบวิเคราะห์ที่เรียกชื่อว่า cobas 6000 analyzer series ทุกส่วนเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Roche Diagnostic ประเทศเยอรมัน
- 7.2 เครื่องปั่น(Centrifuge) : ใช้สำหรับปั่นแยก Serum/Plasma ที่ความเร็วรอบในการปั่น 3,500 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที หลังจากตั้งตัวอย่างเลือดเริ่มต้นทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีก่อนปั่น
- 7.3 น้ำยาตรวจวิเคราะห์ : ใช้น้ำยา ALTP Cat. No. 04467388 190 เป็น cassette ชุดน้ำยาสำเร็จรูปพร้อมใช้งาน(ready-to-use) ผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Roche โดย 1 cassette ตรวจได้ 425 Tests เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C วางให้ตั้งตรง จะมีอายุการใช้งานจนถึงวันหมดอายุที่ระบุข้าง cassette เมื่อเปิดใช้งานบนเครื่อง cobas c 501 แล้วจะมีอายุการใช้งาน 12 สัปดาห์ องค์ประกอบของสารเคมีในน้ำยา ALTP มีดังนี้

R1 TRIS buffer: 224 mmol/L, pH 7.3 (37 °C); L-alanine: 1120 mmol/L; albumin (bovine): 0.25 %; LDH (microorganisms): \geq 45 μ kat/L; stabilizers; preservative

R2 Pyridoxal phosphate: 730 μ mol/L; additives; preservative

R3 2-Oxoglutarate: 94 mmol/L; NADH: \geq 1.7 mmol/L; additives; Preservative

R1 is in position A, R3 is in position B, and R2 is in position C.

7.4 สารปรับแต่งมาตรฐาน :

- 7.4.1 Standard 1: H₂O (sterile distilled water for injection)

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณิ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 5 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

7.4.2 Standard 2: Calibrator for automated system (C.f.a.s), Cat. No. 10759350 190
ผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Roche ขนาดบรรจุขวดละ 3 mL

7.5 สารวัดควบคุมคุณภาพ PreciControl ClinChem Multi 1, PreciControl ClinChem Multi 2
ผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Roche ขนาดบรรจุขวดละ 5 mL ใช้ตรวจวิเคราะห์ทันทีหลังจากทำ daily
maintenance เครื่อง cobas c 501 แล้วเสร็จในช่วงเวลาประมาณ 15.00-18.00 น. ของแต่ละวัน

7.6 Auto pipette, Volumetric pipette 3 mL, 5 mL และ Pipette tip สำหรับใช้เตรียมสารละลาย
calibrator และ control ที่อยู่ในรูปแบบเป็นผงแห้ง (Lyophilize)

7.7 Distilled water สำหรับใช้ละลาย control/calibrator

7.8 Diluent NaCl 9 % (50 mL) สำหรับใช้เจือจางตัวอย่างอัตโนมัติกรณีตัวอย่างตรวจมีค่า ALT สูงเกิน
700 U/L น้ำยา Diluent NaCl 9% เมื่อยังไม่เปิดใช้งานควรเก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C จะมีอายุการใช้งาน
จนถึงวันหมดอายุที่ระบุข้าง cassette เมื่อเปิดใช้งานแล้วจะมีอายุ 12 สัปดาห์

7.9 ภาชนะที่จะใช้บรรจุตัวอย่างตรวจที่แบ่งมา ได้แก่ Sample cup(Hitachi cup) Cat No. 10394246001,
Plastic plain tube, Hitachi micro cup

7.10 Rack มี 8 ชนิด

7.10.1 Rack สีดำ สำหรับวาง calibrator

7.10.2 Rack สีขาว สำหรับวาง control

7.10.3 Rack สีเทา สำหรับวางตัวอย่างที่เป็น Routine

7.10.4 Rack สีแดง สำหรับวางตัวอย่างที่เป็น STAT

7.10.5 Rack สีเหลือง สำหรับวางตัวอย่างที่เป็น Urine

7.10.6 Rack สีน้ำเงิน สำหรับวางตัวอย่างที่เป็น CSF

7.10.7 Rack สีน้ำตาล สำหรับวางตัวอย่างอื่นๆ

7.10.8 Rack สีเขียว ใช้เพื่อบำรุงรักษาเครื่อง

8. สิ่งแวดล้อมและการควบคุมความปลอดภัย (environmental and safety controls)


8.1 ต้องสวมถุงมือยางและเสื้อคลุมขณะปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการติดเชื้อบางชนิดที่อาจปนเปื้อนมากับ
ตัวอย่างตรวจ

8.2 น้ำยามีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวส่วนประกอบของน้ำยาไม่ควรกลืนกินหรือสัมผัสกับผิวหนังโดยตรง

9. ขั้นตอนการสอบเทียบ (calibration procedures; metrological traceability)

ขั้นตอนการสอบเทียบให้ดำเนินการตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือปฏิบัติงาน เรื่อง Operator's manual cobas
6000 analyzer series (MN-LAB-065)

9.1 ข้อกำหนดในการสอบเทียบ

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณิ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 6 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

9.1.1 ทำการสอบเทียบแบบ 2-point calibration กับน้ำยา ALTLP ที่ใช้งานร่วมกับเครื่องตรวจวิเคราะห์ cobas c 501 เมื่อ

- เปิดใช้งานน้ำยา ALTLP ครั้งแรก
- น้ำยา ALTLP เปลี่ยนรุ่นการผลิต(Lot) ใหม่
- มีการทำ preventive maintenance รอบใหญ่หรือมีการเปลี่ยนชิ้นส่วนอะไหล่ที่มีผลกระทบต่อค่าการวัด และเมื่อผล IQC และหรือ EQA/PT บ่งชี้ว่ามี systematic error ที่ต้องแก้ไข ปัญหาด้วยการสอบเทียบใหม่(re-calibration)

9.1.2 การตรวจวัดค่าสารสอบเทียบเพื่อสร้าง Standard curve โดยใช้สารปรับแต่งมาตรฐานจำนวน 2 ระดับ ทำซ้ำอัตโนมัติระดับละ 2 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย สารปรับแต่งมาตรฐานที่ใช้สอบเทียบประกอบด้วย

- Standard 1: H₂O (sterile distilled water for injection)
- Standard 2: Calibrator for automated system (C.f.a.s)


9.2 วิธีการสอบเทียบ

9.2.1 ตรวจสอบรุ่นการผลิต (Lot) ของ C.f.a.s ที่เตรียมจะใช้งาน Lot ที่จะใช้งานต้องตรงกับ Lot ที่เคย download ข้อมูลการกำหนดค่า ALT เก็บไว้ในเครื่อง cobas c 501 ถ้าหาก Lot ที่จะใช้งานไม่ตรงกับ Lot ที่มีอยู่ในเครื่อง ให้ download ข้อมูล C.f.a.s Lot ใหม่ในขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ Standby โดยปฏิบัติตามหัวข้อ “การตรวจสอบ lot และการ download calibrator” ในคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator's manual cobas 6000 analyzer series (MN-LAB-065)

9.2.2 นำขวดที่บรรจุผง C.f.a.s มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10-20 นาที แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 3 mL โดยใช้ Volumetric pipette ปิดฝาขวดให้สนิท ตั้งขวดทิ้งไว้ 10-20 นาที เมื่อครบเวลาให้ผสมให้เข้ากันโดยการแกว่งสารละลายร่วมกับหมุนขวดเบาๆ ให้เป็นวงกลมโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ห้ามผสมด้วยเครื่อง Mixer เพื่อป้องกันโปรตีนถูกทำลายโดยเฉพาเอนไซม์จะสูญเสีย Activity ไปได้ จากนั้นวางขวดคว่ำไว้อีก 5-10 นาที เมื่อครบเวลาให้ผสมให้เข้ากันจนส่วนที่เป็นผงละลายหมดแล้วจึงหยางขวดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้สารที่ละลายเข้าละลายให้สมบูรณ์ เสร็จแล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งก่อนนำไปใช้งานที่อุณหภูมิห้อง หรือแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ (-25 °C) – (-20 °C) ใน Hitachi cup 300-500 ไมโครลิตร /cup กรณีมีการนำ C.f.a.s. ที่เก็บแช่แข็งไว้มาใช้งานให้นำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-20 นาที หรือจนกว่าจะหายเย็น แล้วจึงผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์

9.2.3 บรรจุน้ำกลั่นประมาณ 300-500 ไมโครลิตรลงใน Sample cup(Hitachi cup) แล้วใส่ลงไปในห้องที่ติดฉลากว่า “H₂O” ของ Rack สีดำ

9.2.4 นำ C.f.a.s ที่ละลายจนพร้อมใช้งานแล้วประมาณ 300-500 ไมโครลิตรใน Sample cup(Hitachi cup) ใส่ลงไปในห้องสีดำนั่นเดียวกันกับในข้อ 9.2.3 แล้วทำการ calibrate น้ำยาโดยการปฏิบัติตามหัวข้อ “การทำ calibration” ในคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator s manual cobas 6000 analyzer series (MN-LAB-065)

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณณสีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 7 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

10. ขั้นตอนของกระบวนการ (procedural steps)

10.1 วิธีการเตรียมเครื่องมือ น้ำยา และตัวอย่างตรวจ ก่อนการตรวจวิเคราะห์

10.1.1 วิธีการเตรียมเครื่องมือ

- เครื่องตรวจวิเคราะห์จะทำ Daily begin เวลา 05.00 น. โดยอัตโนมัติ
- ลงชื่อเข้า(Operator ID) และรหัสผ่าน>Password) เพื่อเข้าใช้งานระบบ (logon)เครื่องตรวจวิเคราะห์ cobas 6000
- ตรวจสอบปริมาณน้ำยา Auxiliary ที่บรรจุในรูปแบบ cassette ได้แก่ NaOH-D cassette, SMS cassette, 9%NaCl cassette ที่เหลือในเครื่อง ถ้าปริมาณน้ำยาต่ำกว่าระดับที่กำหนดไว้ หน้าจอจะแสดงพื้นหลังรายการน้ำยานั้นเป็นสีม่วง ให้ใส่น้ำยา cassette ใหม่เข้าไปแทน
- ตรวจสอบปริมาณและเติมน้ำยา Auxiliary อื่นๆ ได้แก่ NaOH-D, Cell Detergent 1, Acid Wash Solution, Cell Detergent 2 ถ้าปริมาณน้ำยาต่ำกว่าระดับที่กำหนดไว้ หน้าจอจะแสดงพื้นหลังรายการน้ำยานั้นเป็นสีม่วง ให้ใส่น้ำยาขวดใหม่เข้าไปแทน

10.1.2 วิธีการเตรียมน้ำยา (reagent preparation)

- นำ Cassette น้ำยา ALTLTP ออกจากตู้เย็น แกะพลาสติกออก ระวังไม่ให้มือหรือน้ำสัมผัส แถบ barcode
- เขียนวันเปิดใช้บน Cassette น้ำยา ALTLTP ก่อนนำเข้าเครื่อง และลงบันทึกการเปิดใช้น้ำยาแต่ละ Cassette ในแบบบันทึกการนำออกมาใช้งานน้ำยา สารมาตรฐาน วัสดุอ้างอิง สารควบคุม และสิ่งอุปกรณ์อื่นๆ (FM-LAB- 187)
- นำ Cassette น้ำยา ALTLTP ใส่เครื่อง โดยหัน barcode ไปทางด้านขวา สอดเข้าตรง cassette loading port ดันเข้าไปเบาๆ ให้สุด ห้ามใส่น้ำยาเข้าไปในเครื่องขณะเครื่องอยู่ในสถานะ preparation เครื่องจะเจาะรูที่ฝาน้ำยาและนำไปเก็บใน reagent disk พร้อมกับ register น้ำยาโดยอัตโนมัติ โปรแกรมของระบบเครื่องมือจะเริ่มนับอายุของน้ำยาถอยหลังจนถึงวันหมดอายุที่กำหนดไว้ 12 สัปดาห์

10.1.3 การเตรียมตัวอย่างตรวจ

- สิ่งส่งตรวจต้องไม่อยู่ในลักษณะเข้าเกณฑ์ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ
- สิ่งส่งตรวจมีสารรบกวนปฏิกิริยาได้ไม่เกินตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 13. สารรบกวน การทดสอบเมื่อปั่นแยกสิ่งส่งตรวจได้ Serum/Plasma แล้ว ที่ด้านบนผิวของสิ่งส่งตรวจ ต้องไม่มีฟองหรือก้อนไฟบรินลอยอยู่ และควรมีส่วนของ Serum/Plasma อย่างน้อย 500 μ L

10.2 ถ้ายังไม่มี การสอบเทียบน้ำยา ALTLTP Lot ที่ใช้งานอยู่ ให้ดำเนินการตามข้อ 9.

10.3 ถ้ายังไม่มี การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพในรอบวันนั้น ให้ดำเนินการตามวิธีการในข้อ 11.

10.4 นำตัวอย่างผู้ป่วยเข้าเครื่อง cobas c 501 ผ่าน core unit ของเครื่อง cobas 6000 analyzer series โดยสามารถใช้ Primary tube ขนาด 13x75 mm. ที่มีตัวอย่างไม่น้อยกว่า 500 ไมโครลิตร(sample dead volume 500 μ L) วางบน Rack สีเทา(กรณีไม่เร่งด่วน) หรือ Rack สีแดง(กรณีต้องการผลด่วน) หรือใช้ Automatic pipette ดูดตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 ไมโครลิตร(sample dead volume 100 μ L) ใส่ใน Sample cup (Hitachi cup) วางบน Rack

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณณสีวะระ	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 8 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

10.5 สิ่งทำการตรวจวิเคราะห์และเรียกดูผลตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator's manual cobas 6000 analyzer series(MN-LAB-065) โดยเครื่อง cobas c 501 จะทำการตรวจวิเคราะห์ ALT ด้วยระบบอัตโนมัติ ตาม Test parameter/definition ที่กำหนดไว้ ดังนี้

Cobas c 501 ALT test definition

Assay type	Rate A		
Reaction time / Assay points	10 / 44-70		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Decrease		
Units	U/L (µkat/L)		
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	59 µL	32 µL	
R2	20 µL	-	
R3	20 µL	20 µL	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	9 µL	-	-
Decreased	9 µL	15 µL	135 µL
Increased	9 µL	-	-

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O S2: C.f.a.s.
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	2-point calibration - after reagent lot change - as required following quality control
	Procedures

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

10.6 รายงานผลการวิเคราะห์ที่ได้หน่วยเป็น U/L ในกรณีที่มีค่าสูงเกิน 700 U/L ให้นำตัวอย่างออกมาจากเครื่องแล้วนำเข้าเครื่องอีกครั้งเพื่อส่งตรวจใหม่ เครื่อง cobas c 501 จะ dilute อัตโนมัติ 1:10 เมื่อตรวจเสร็จจะแสดงค่า ALT ที่คูณด้วย 10 ให้เรียบร้อย

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 9 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ (quality control procedures)

11.1 ข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพ

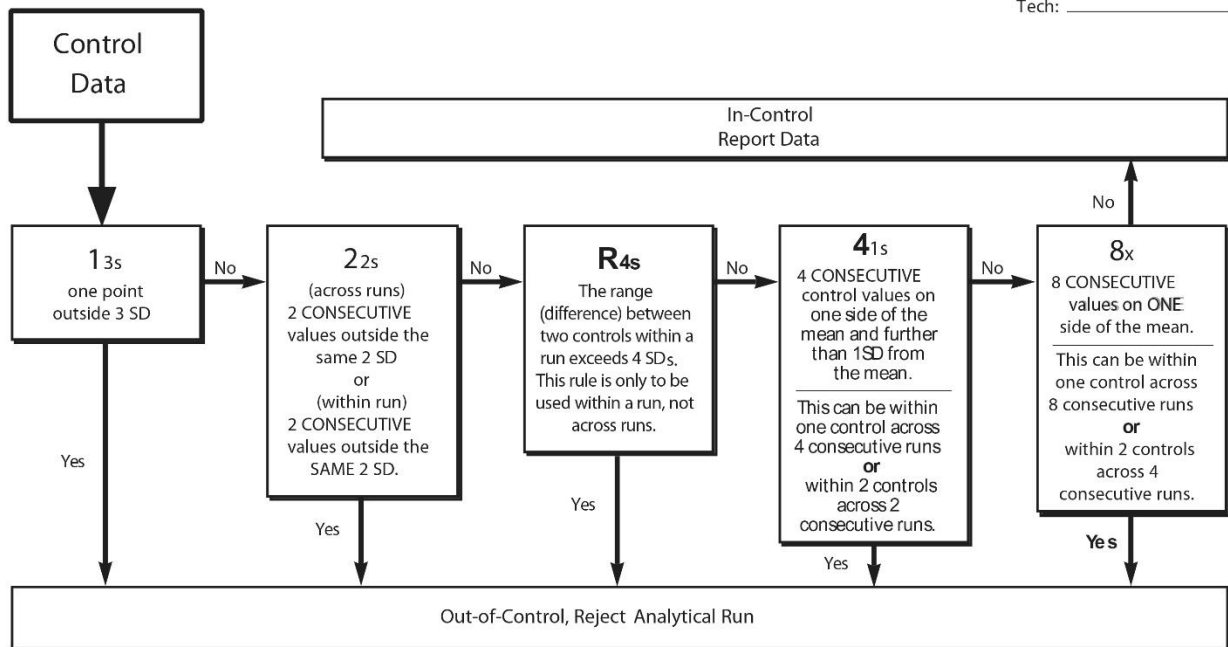
ให้อ้างอิงระเบียบปฏิบัติงานเรื่องการสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21)

11.1.1 เกณฑ์การตัดสินผลการควบคุมคุณภาพภายใน ให้พิจารณาเลือกใช้กฎบางกฎที่แนะนำไว้ใน Modern "Westgard Rules" ได้แก่ 1-3S, 2-2S หรือ 2of3-2S, R-4S ร่วมกับเกณฑ์ between run $CV \leq 0.33TEa$ และ Peer group $SDI \leq 1$ โดยการติดตามตรวจสอบและประเมินผลการควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจวิเคราะห์ ALT ใน Quality control chart (Levey-Jennings chart) ที่สร้างขึ้นมาจากการหาค่า Mean, SD ของห้องปฏิบัติการ

Modern "Westgard Rules": N's of 2 and 4

Date: _____

Tech: _____



Problem: _____

Resolution: _____

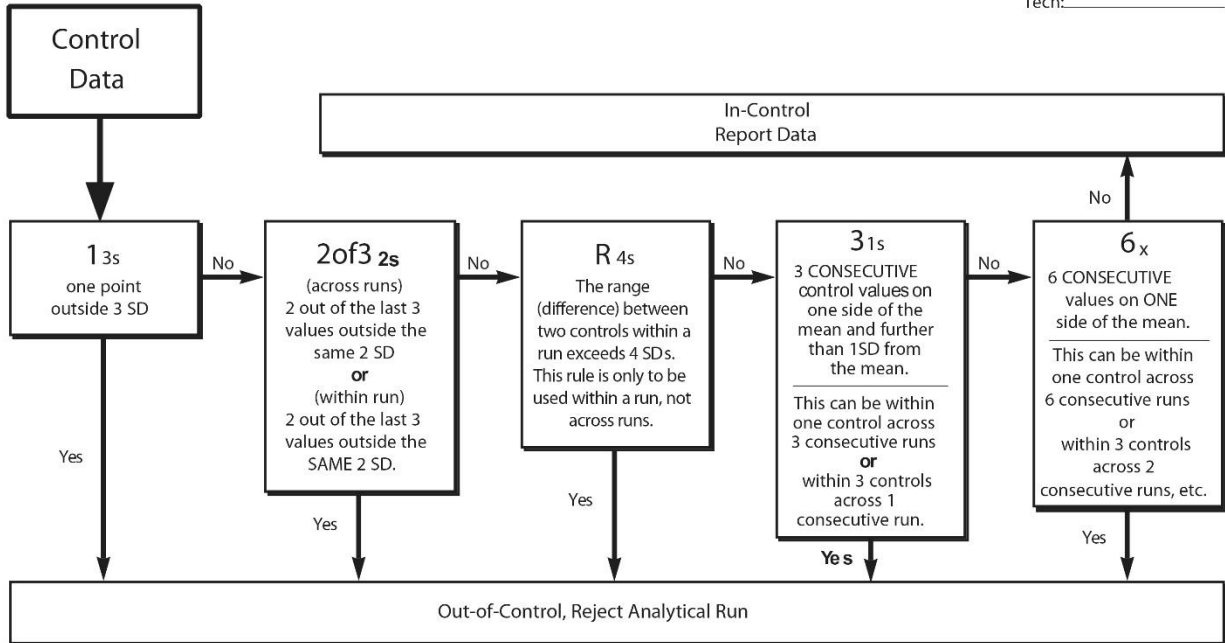
Find out more at <http://www.westgard.com>

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณณสีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 10 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

Modern "Westgard Rules": N's of 3 and 6

Date: _____

Tech: _____



Problem: _____

Resolution: _____

Find out more at <http://www.westgard.com>

- 11.1.2 PreciControl ClinChem Multi 1, PreciControl ClinChem Multi 2 เป็นสารวัสดุควบคุมคุณภาพชนิดซีรัมแห้ง ผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Roche ขนาดบรรจุขวดละ 5 mL ใช้ตรวจวิเคราะห์ ALT ทั้ง 2 ระดับทันทีหลังจากทำ Daily End maintenance เครื่อง cobas c 501 (ได้แก่ การทำ Clean probe and nozzles+Process green wash rack) แล้วเสร็จในช่วงเวลาประมาณ 15.00-18.00 น. ของแต่ละวัน ความถี่วันละ 1 ครั้ง (N=2, R=1)
- 11.1.3 ใช้ค่า Allowable total error (TEa) ของการทดสอบ ALT = $\pm 15\%$ (อ้างอิงจาก CLIA 2019)
- 11.1.4 ติดตามค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของการทดสอบระหว่างวัน (between-day imprecision) โดยใช้เกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ between-run CV ต้องไม่เกิน 5%
- 11.1.5 การละลายสารวัสดุควบคุมคุณภาพ PreciControl ClinChem Multi 1, PreciControl ClinChem Multi 2 ที่เป็นผงซีรัมแห้ง (Lyophilized serum) ก่อนละลายให้นำขวดบรรจุซีรัมแห้งนี้มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อน 10-20 นาที จนมั่นใจว่าได้อุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง และในเวลาเปิดฝาขวดให้เปิดด้วยความระมัดระวัง เพราะการบรรจุขวดใช้ระบบสุญญากาศ ถ้าเปิดทันทีจะทำให้ผงซีรัมแห้งที่อยู่ภายในขวดปลิวออกมาได้ ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นไม่ถูกต้อง ใช้ Volumetric pipette ดูดจ่ายตัวทำละลาย (น้ำกลั่น) 5 mL ลงไปละลายผงซีรัมแห้ง ปิดฝาขวดให้สนิท ตั้งขวดทิ้งไว้ 10-20 นาที เมื่อครบเวลาให้ผสมให้เข้ากัน โดยการแกว่งสารละลายร่วมกับหมุนขวดเบาๆ ให้เป็นวงกลมโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ห้าม
- เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด



ผสมด้วยเครื่อง Mixer เพื่อป้องกันโปรตีนถูกทำลายโดยเฉพาะเอนไซม์จะสูญเสีย Activity ไปได้ จากนั้นวางขวดคว่ำไว้อีก 5-10 นาที เมื่อครบเวลาให้ผสมให้เข้ากันจนส่วนที่เป็นผงละลายหมดแล้วจึงหยางขวดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้สารที่ละลายช้าละลายให้สมบูรณ์ เสร็จแล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งก่อนนำไปใช้งานที่อุณหภูมิห้องหรือแบ่งเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าเท่ากับ 20°C ถ้ามีการแบ่งเก็บในช่องแช่แข็ง (-25°C) – (-20°C) หรือ $2-8^{\circ}\text{C}$ ก่อนนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ต้องนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-20 นาที เพื่อให้ได้อุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้องก่อน และให้ใช้แนวทางเดียวกันนี้ในการละลาย Calibrator


11.2 วิธีการควบคุมคุณภาพ

- 11.2.1 ตรวจสอบ Lot ของสารวัสดุควบคุมคุณภาพระหว่าง Lot ที่จะใช้งานกับ Lot ที่มีอยู่ในเครื่อง ถ้า Lot ไม่ตรงกันให้ download ข้อมูลของสารวัสดุควบคุมคุณภาพให้ตรงกันกับ Lot ใหม่ ในขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ Standby เท่านั้น
- 11.2.2 เตรียมสารวัสดุควบคุมคุณภาพ(control material) ให้พร้อมใช้ตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนดไว้ในเอกสารแนบของสารวัสดุควบคุมคุณภาพที่ใช้งาน
- 11.2.3 บรรจุสารวัสดุควบคุมคุณภาพปริมาตร 300-500 ไมโครลิตร(sample dead volume 100 uL) ลงใน Sample cup (Hitachi cup) แล้วนำไปวางใน Rack สีขาว ในตำแหน่งที่กำหนดไว้
- 11.2.4 สั่งให้เครื่องทำ control โดยการปฏิบัติตามหัวข้อ “การทำ Control” ในคู่มือปฏิบัติงาน Operator s manual cobas 6000 analyzer series(MN-LAB-065)
- 11.2.5 ติดตามตรวจสอบผล IQC ของการทดสอบ ALT ด้วยกฎการควบคุมคุณภาพ(control rule) ตาม QC procedure ที่กำหนดไว้อย่างสม่ำเสมอเนื่องด้วยข้อมูลที่เป็นกราฟ ให้ติดตามแนวโน้ม ความเสี่ยงที่จะเกิดความคลาดเคลื่อน เพื่อเตรียมการแก้ไขและป้องกันก่อนทำการทดสอบตัวอย่างผู้ป่วย ดังนี้

- การติดตามผล IQC จากผลการตรวจวิเคราะห์PreciControl ClinChem Multi 1, PreciControl ClinChem Multi 2 ให้ติดตามตรวจสอบผล IQC เบื้องต้นของการตรวจ ALT ในรูปแบบกราฟผ่าน control unit ของเครื่อง cobas 6000 ได้ 3 รูปแบบที่เมนู QC > run status (แสดงผล QC ของทุก test ในกราฟเดียวกัน แสดงค่าของแต่ละ test ว่าตกอยู่ในขอบเขต $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ หรือไม่), QC > individual(ใช้ตรวจสอบผล IQC โดยละเอียดเป็นราย test มีกราฟแบบ Levey-Jennings chart) และ QC > cumulative (คล้ายหน้า individual เป็นข้อมูลในหน้า individual ซึ่งถูกเลือกเป็นตัวแทนมาเก็บไว้ที่หน้า cumulative)

- ติดตามตรวจสอบผล IQC ให้ละเอียดมากขึ้นใน Levey-Jennings chart สำหรับการตรวจวิเคราะห์ ALT โดยใช้โปรแกรม TIQCon (Total Integrated Quality Control for clinical laboratory) ผลิตภัณฑ์ Roche ช่วยประมวลผล รวมถึงการเปรียบเทียบผลกับ Peer group และ ตรวจสอบผล IQC แบบอัตโนมัติตาม control rule ที่กำหนดไว้

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณณสีระรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 12 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

11.2.6 เมื่อผลการทำ IQC มีการละเมิดกฎการควบคุมคุณภาพ (out of control) และผลการทดสอบ ALT มีแนวโน้มที่จะผิดพลาดทางคลินิกอย่างมีนัยสำคัญให้ผู้จัดการคุณภาพพิจารณาสั่งงดออกผลการตรวจตัวอย่างผู้ป่วย ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิกและผู้เกี่ยวข้องร่วมกันดำเนินการแก้ไขและทวนสอบลักษณะประสิทธิภาพ ลงบันทึกรายละเอียดการปรับปรุงแก้ไขที่ทำไปเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล IQC ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-025) เมื่อทำการแก้ไขสาเหตุของความคลาดเคลื่อนแล้วจึงจะตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผู้ป่วยซ้ำ รวมทั้งย้อนกลับไปพิจารณารายงานผลวิเคราะห์ที่ออกผลไปแล้วนับตั้งแต่การทำควบคุมคุณภาพภายในรอบก่อนหน้านี้นี้

12. ขั้นตอนการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparisons)


- 12.1 ห้องปฏิบัติการเข้าร่วม EQAS Clinical Chemistry(Monthly) Program เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ ALT ระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งให้บริการโดย BIO-RAD Laboratories มีกำหนดการสมัครสมาชิกปีละ 1 ครั้ง ควรสมัครสมาชิกในห้วงไม่เกินเดือนมิถุนายนของทุกปี ความถี่ในการประเมินเดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-มิถุนายน รวม 12 ครั้ง/ปี
- 12.2 ผู้ตรวจวิเคราะห์ที่รับผิดชอบงานตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกในขณะนั้นดำเนินการตรวจวิเคราะห์หาค่า ALT ร่วมกันกับรายการทดสอบอื่นๆ ในตัวอย่างจากโปรแกรม EQAS โดยการตรวจพร้อมกันไปกับ การตรวจตัวอย่างผู้ป่วยในงานประจำวันไม่เกินวันกำหนดส่งรายงานที่ระบุไว้บนฉลากข้างขวดบรรจุตัวอย่าง EQAS ของแต่ละเดือน
- 12.3 บันทึกส่งรายงานผล online เข้าประเมิน(submit results) ดูผลหรือพิมพ์ผลการประเมิน(view or print EQAS reports) ทาง www.QCNet.com
- 12.4 เมื่อโปรแกรม EQAS ประเมินผลเสร็จแล้ว ให้ Download รายงานผลมาเก็บไว้ใช้ทบทวนประสิทธิภาพในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ
- 12.5 ตรวจสอบผลการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจ ALT โดยใช้เกณฑ์และเป้าหมายดังนี้
 - Absolute Z-score เกณฑ์ผ่าน < 3.0, เป้าหมายที่ต้องการ < 1.5
 - Z-score เป็นการวัดข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ ALT ของห้องปฏิบัติการว่าห่างจากค่าเฉลี่ยของ peer group เป็นกี่เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peer group
 - TE < TEa, เมื่อ TEa = ±15 (CLIA 2019), %TE=%Bias+1.65%CV
 - Bias < Bias goal, เมื่อ Bias goal = 6.75%
- 12.6 ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิกและเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องหารือกันเมื่อผลการประเมิน ALT ไม่เป็นไปตามเกณฑ์หรือเป้าหมายที่กำหนด และบันทึกมาตรการแก้ไข/ป้องกัน ในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล EQA ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-020)

13. สิ่งรบกวน (Interferences)

Criterion: Recovery within ± 10 % of initial value at an ALT activity of 35 U/L

- 13.1 ซีรัม/พลาสมา ที่มีส่วนประกอบต่อไปนี้ไม่รบกวนการทดสอบ

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสียะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 13 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

ลักษณะ ซีรัม/พลาสมา		ปริมาณของส่วนประกอบ	การเกรดปริมาณ
Icterus	I index \leq 60	unconjugated bilirubin และ conjugated bilirubin \leq 60 mg/dL	4+
Hemolysis	H index \leq 170	hemoglobin \leq 170 mg/dL	2+
Lipemic (Intralipid)	L index \leq 150	L index หรือความขุ่น ไม่สัมพันธ์กับ ปริมาณ Triglyceride	1+


- Icterus: ระดับ I index น้อยกว่า 60 หรือเทียบเท่าระดับ Conjugated bilirubin และ Unconjugated - bilirubin น้อยกว่าเท่ากับ 60 mg/dL ไม่รบกวนการตรวจวิเคราะห์
- Hemolysis: ระดับ H index น้อยกว่าเท่ากับ 170 หรือเทียบเท่า Hemoglobin ความเข้มข้นน้อยกว่าเท่ากับ 200 mg/dL ไม่รบกวนการตรวจวิเคราะห์
- การปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงจะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีค่าสูงเกินกว่าความเป็นจริง เพราะ analyte level ในเม็ดเลือดแดงมีค่าสูงกว่าใน normal serum ส่วนระดับของการปนเปื้อนจะขึ้นอยู่กับปริมาณ analyte ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง
- Lipimia: Intralipid ที่มีระดับ L index น้อยกว่า 150 ไม่รบกวนการตรวจวิเคราะห์ (L index ใช้การวัดความขุ่น ซึ่งจะไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณ Triglyceride ในเลือด)
- Lipemic sample อาจส่งผลให้เกิด >ABS alarm ดังนั้นควรตั้ง dilute sample ใน automatic rerun mode
- ไม่พบการรบกวนของ Drug เมื่อทำทดสอบด้วย Common drug panels ยกเว้น Calcium dobesilate จะส่งผลให้เกิดผลต่ำปลอมของ ALT
- Cyanokit (Hydroxocobalamin) may cause interference with results.
- Physiological plasma concentrations of Sulfasalazine or Sulfapyridine may lead to false results
- ใน rare case ของ gammopathy โดยเฉพาะ IgM type (Waldenström's macroglobulinemia) อาจส่งผลให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่น่าเชื่อถือ

14. หลักการของขั้นตอนการคำนวณเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ รวมทั้งที่เกี่ยวข้องกับความไม่แน่นอนของการวัด (principle of procedure for calculating results including, where relevant, the measurement uncertainty of measured quantity values)

14.1 เครื่อง cobas c 501 จะคำนวณค่า analyte activity ของ ALT ในแต่ละตัวอย่างตรวจให้โดยอัตโนมัติ

14.2 Conversion factor: $U/L \times 0.0167 = \mu\text{kat/L}$

14.3 การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ALT ให้ปฏิบัติตาม “หัวข้อ 4.4 การตรวจสอบความไม่แน่นอนของการวัดจากค่าเชิงปริมาณ ในเรื่องระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การจัดการกระบวนการทดสอบ

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณิ์สีระรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 14 จาก 18 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

(WP-LAB-20)” ลงบันทึกไว้ใน “ตารางการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในการทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์(FM-LAB-281)”

15. ช่วงอ้างอิงทางชีวภาพหรือค่าการตัดสินใจทางคลินิก(biological reference intervals or clinical decision values)

Expected Values: ชาย < 50 U/L
หญิง < 35 U/L

วิทยาลัยอเมริกันแห่งสมาคมอายุรแพทย์อเมริกัน(The American College of Physical-American Society of Internal Medicine) ได้เสนอแนะว่า แพทย์แผนปัจจุบันสมควรได้รับปรุงค่าอ้างอิง ALT ให้ทันสมัย และสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ค้นพบใหม่จากโรคสำคัญ 2 โรค คือ 1) โรคตับอักเสบจากเชื้อไวรัสตับอักเสบนิตซี(Hepatitis C virus, HCV) และ 2) โรคไขมันพอกตับ (fatty liver disease, FLD) เนื่องจากการดำเนินของสองโรคนี้นักเป็นไปอย่างเงียบๆ พบค่า ALT มักไม่เกิน 48 U/L ซึ่งอาจทำให้เข้าใจว่าเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีเช่นคนทั่วไป จึงมีข้อเสนอแนะให้ใช้ค่าอ้างอิงของ ALT ใหม่ที่เหมาะสม ดังนี้

Expected Values (ตามข้อเสนอแนะใหม่): ชาย < 30 U/L
หญิง < 19 U/L

16. ช่วงที่รายงานผลการทดสอบได้ (reportable interval of examination results)

ค่า Analytical Measurement Range ของ ALT เท่ากับ 5 - 700 U/L

17. คำแนะนำสำหรับการพิจารณาผลเชิงปริมาณเมื่อผลไม่ได้อยู่ในช่วงการวัด (instructions for determining quantitative results when a result is not within the measurement interval)


ถ้าผลการทดสอบ ALT >700 mg/dL เครื่อง cobas c 501 ที่มีการตั้ง automatic rerun function ไว้ เมื่อนำตัวอย่างออกจากเครื่องแล้วนำเข้าเครื่องและสั่งตรวจใหม่ เครื่อง cobas c 501 จะเจือจางสิ่งส่งตรวจในอัตราส่วน 1:10 ผลที่ได้เครื่องจะคำนวณโดยคูณ dilution factor = 10 ให้โดยอัตโนมัติ

18. ค่าวิกฤติ/ค่าแจ้งเตือน/ที่เหมาะสม (alert/critical values, where appropriate)

ไม่มี

19. การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ (laboratory clinical interpretation)

ALT ของร่างกายส่วนใหญ่ผลิตมาจากตับ การบาดเจ็บเสียหายของอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ ไต หัวใจ กล้ามเนื้อ จะมีระดับ ALT สูงขึ้นไม่มาก ในเม็ดเลือดแดงมีปริมาณ ALT น้อยกว่า AST ถ้าเซลล์ตับได้รับบาดเจ็บเสียหาย ระดับ ALT จะสูงขึ้นเด่นชัดมากกว่าอวัยวะอื่นๆ ในผู้ป่วยโรคตับอักเสบ(hepatitis) และโรคตับแข็ง (cirrhosis) ถึงแม้อาการภายนอกของผู้ป่วยสองโรคนี้นี้จะไม่แสดงสภาวะตัวเหลืองตาเหลือง แต่ค่า ALT จะมีระดับสูงขึ้นในเลือดค่า ALT จึงเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญและมีความจำเพาะต่อโรคตับ มากกว่า AST เช่นกรณี AST มีค่าผิดปกติมากๆ ถ้าหากมีค่า ALT สูงขึ้นผิดปกติมากๆ สอดคล้องกัน จะช่วยวินิจฉัยได้ว่าน่าจะเกิดจากโรคตับมากกว่าจะเกิดจากโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด เป็นต้น

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 15 จาก 18 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

19.1 การแปลผลโดยพิจารณาเฉพาะระดับ ALT

19.1.1 ค่า ALT ต่ำ : การพบค่า ALT ต่ำกว่าช่วงค่าปกติ อาจเกิดจาก

- อาจเป็น 5% ของกลุ่มคนสุขภาพดีที่ไม่อยู่ในช่วงค่าอ้างอิงของคนสุขภาพดีส่วนใหญ่
- Activity ของ ALT อาจต่ำในตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังซึ่งอาจไม่เกี่ยวข้องกับระดับวิตามินบี 6
- อาจพบได้ในโรคที่เกี่ยวกับท่อน้ำดี (biliary disease)

19.1.2 ค่า ALT สูง : เนื่องจาก ALT เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเนื้อเยื่อตับ, หัวใจ, กล้ามเนื้อ และไต แต่จะพบมากที่สุด ดังนั้นค่าเอนไซม์ ALT ที่สูง จึงพบได้ในโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อเหล่านี้ ค่า ALT จะแสดงค่าสูงมากหรือน้อยตามจำนวนเซลล์ที่มีเอนไซม์นี้ที่บาดเจ็บ (hepatocyte injury) ซึ่งจะมีเอนไซม์อื่นๆ จากตับที่สูงขึ้นร่วมด้วย ได้แก่ AST, ALP, GGT

19.1.2.1 ค่า ALT สูงไม่มาก อาจสูงขึ้นเล็กน้อยเป็นครั้งคราว

- กล้ามเนื้ออักเสบ (myositis)
- โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction)
- มีโรคหรือสภาวะใดที่กระทบต่อตับ หัวใจ กล้ามเนื้อ ไต

19.1.2.2 ค่า ALT สูงเล็กน้อยถึงปานกลาง บ่งชี้สภาวะหรือโรคต่างๆ ดังนี้

- อาจเริ่มมีอาการของโรคตับแข็ง
- อาจเริ่มมีสภาวะโรคตับอักเสบจากสาเหตุต่างๆ เช่น จากยา แอลกอฮอล์ หรือจากอาหารที่เป็นพิษ

19.1.2.3 ค่า ALT สูงในระดับปานกลางถึงสูง

- ตับอักเสบจากการติดเชื้อไวรัส Epstein-Barr Virus, EBV) ที่ก่อโรค Infectious mononucleosis
- ตับอักเสบจากการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อย่างหนัก จนมีโอกาสเป็นโรคตับแข็ง
- ตับอักเสบในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อไวรัส หรือระยะที่ได้รับการรักษาจนอาการเริ่มดีขึ้น
- ช่องทางน้ำดีอุดตันซึ่งอาจเกิดจากท่อน้ำดีอักเสบหรือมีนิ่วในถุงน้ำดี
- ตับได้รับพิษจากยาชนิดไม่ร้ายแรงนัก
- มะเร็งตับ

19.1.2.4 ค่า ALT สูงถึง 50 เท่าขึ้นไป โดยมีค่า AST สูงร่วมด้วยในระดับที่ต่ำกว่า พบได้ใน

- เซลล์ตับกำลังเสียหายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบชนิด A, B, หรือ C
- เซลล์ตับเสียหายจากพิษของยาที่รับประทาน
- ตับอาจอยู่ในสภาวะขาดเลือด (hepatic ischemia) เช่น กรณีหัวใจล้มเหลว

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา		
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)		
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 16 จาก 18 หน้า	
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

19.2 การแปลผลโดยพิจารณาอัตราส่วนระหว่าง AST กับ ALT

DeRitis Ratio Decision Limit				
Condition	AST : ALT ratio			
	<1.0	1.0 to <1.5	1.5 to <2.0	≥2.0
แข็งแรง (Healthy)	Woman (up to 1.7) Men (up to 1.3)		เด็ก (Children)	ทารก (Neonate)
Acute Viral Hepatitis	เรื้อรัง (Resolving)		แย่ลง (Worsening)	ตับวาย (Fulminant)
Alcoholic Hepatitis	เรื้อรัง (Resolving)		ติดสุรา (Alcohol abuse)	Acute hepatitis
Chronic Liver Disease	คงที่ (Stable)	เสี่ยงต่อการเกิดพังผืด (Fibrosis risk)		Other causes
Muscle Disease	เรื้อรัง (Chronic)	เรื้อรัง (Resolving)		เฉียบพลัน (Acute)

- 19.2.1 DeRitis Ratio เป็นเพียงให้ข้อสันนิษฐานทั่วไปในขั้นต้น มิใช่ข้อบ่งชี้ที่ชัดเจน
- 19.2.2 กรณีค่า ALT สูงเกินกว่า 400 U/L เป็นระดับค่าที่ช่วยวินิจฉัยว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัส จึงไม่จำเป็นต้องพิจารณาอัตราส่วน
- 19.2.3 AST, ALT เป็น liver enzyme ค่าที่สูงขึ้นแสดงถึง hepatocyte หรือ bile duct injury
- 19.2.4 ทั้ง AST, ALT เป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อหลายชนิด แต่ AST พบได้มากในตับ, กล้ามเนื้อ, หัวใจ พบในปริมาณต่ำๆ ในไต, เม็ดเลือดแดง ส่วน ALT พบได้มากที่ตับ
- 19.2.5 ในเม็ดเลือดแดงมีสัดส่วนของ AST มากกว่า ALT
- 19.2.6 AST พบอยู่ที่ cytoplasm และ mitochondrial แต่ ALT พบเฉพาะใน cytoplasm
- 19.2.7 Half-life ของ AST ประมาณ 17 +/- 5 ชั่วโมงและของ ALT ประมาณ 47 +/- 10 ชั่วโมง แสดงว่า ALT จะสูงในเลือดนานกว่า AST
- 19.2.8 AST/ALT ratio ขึ้นกับอายุ และเพศ โดยเพศชายจะสูงกว่าเพศหญิง (เพราะเพศชายมี muscle mass มากกว่า)
- 19.2.9 การแปลผลจะดูระดับการสูงขึ้นของ liver enzyme, สัดส่วนของ AST : ALT และ ความเร็วในการลดระดับลงและครึ่งชีวิตของ liver enzyme

20. แหล่งที่มาของค่าแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น (potential sources of variation)

20.1 น้ำยา (Reagent)

- เสื่อมสภาพจากการเก็บรักษาไม่ถูกต้องหรือหมดอายุ
- เปลี่ยน lot ใหม่, เปลี่ยน ALTLP cassette อันใหม่
- มีฟองอากาศ ปริมาตรไม่เพียงพอ

เอกสารควบคุม มีอายุการใช้งาน 1 ปี นับจากวันที่ปรับปรุงแก้ไขครั้งล่าสุด

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณส์สระรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 17 จาก 18 หน้า
แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566	

- เก็บรักษา ALTP cassette โดยไม่ต้องให้ตรงอาจทำให้เกิดฟองอากาศ

20.2 สารสอบเทียบ (Calibrator)


- เทคนิคการละลาย เช่น ละลายผิวดัดส่วน, เทคนิคในการเตรียมผิวดผลาด(การไปเปตต์, ระยะเวลาในการละลายสั้นหรือยาวเกินไป(ควรใช้ระยะเวลาในการละลายประมาณ 40 นาทีโดยใช้เทคนิคตามคำแนะนำของผู้ผลิต), การละลายสารสอบเทียบที่แช่แข็งให้ได้อุณหภูมิห้อง(freeze-thaw)ใช้เวลานานเกินไปหรือเร็วเกินไป, ตัวทำละลายสกปรก(ควรใช้ Purified Water Diluents หรือ reagent grade water), ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันเนื่องจากผสมให้เข้ากันไม่ดีตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมไปจนถึงการผสมให้เข้ากันไม่ดีก่อนการตรวจวัดค่าของ calibrator
- มีการระเหยเนื่องจากการบรรจุ calibrator ปริมาณน้อยใน sample cup ร่วมกับการตั้งทิ้งไว้นาน หรือนำ Calibrator ที่เหลือซึ่งผ่านการใช้แล้วมาใช้สอบเทียบซ้ำอีก
- เปลี่ยน lot ใหม่
- เสื่อมสภาพหรือหมดอายุ
- มีฟองอากาศ
- ใช้ Blank ไม่เหมาะสม

20.3 เครื่องมือ (Analyzer)

- แหล่งกำเนิดแสง (source lamp) เสื่อมตามอายุการใช้งาน (ควรเปลี่ยนทุกๆ 1 เดือน)
- ท่อนำส่งน้ำยาที่ต่อเชื่อมกับ reagent probe อุดตัน ตีบ ขาดความยืดหยุ่น
- Cuvette สกปรก
- probe สกปรก
- กระแสไฟฟ้าไม่คงที่
- ระยะเวลา Calibration (วงรอบการทำ re-calibration ไม่เกิน 90 วัน)
- Measurement syringe รั่ว/เสื่อม
- หลังการทำ preventive maintenance ครั้งใหญ่ หรือเปลี่ยนอะไหล่ใหม่ เช่น source Lamp, reagent probe, sample probe แล้วไม่ได้ calibration ใหม่
- ทำ maintenance check หรือทำ preventive maintenance เลยวงรอบหรือไม่ทำตามเงื่อนไขคำแนะนำที่ผู้ผลิตเครื่องมือกำหนด

20.4 ตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ (Sample)

- ตัวอย่างมีการ clot ในระหว่างการตรวจวิเคราะห์ในเครื่องวิเคราะห์
- ตัวอย่างมีการระเหยเนื่องจากตั้งทิ้งไว้นานเกินไปก่อนถูก sample probe ดูดไปตรวจวิเคราะห์ โดยเฉพาะกรณีที่มีการแบ่งตัวอย่างปริมาณน้อยใส่ Hitachi cup/Hitachi micro cup

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษณิ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง : การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)	
	รหัสเอกสาร : WI-LAB-019	หน้า 18 จาก 18 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 2	วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 2566

21. เอกสารอ้างอิง (references)

- 21.1 ใบแทรกน้ำยา ALTLP (PI-LAB-019)
- 21.2 คู่มือปฏิบัติงานเรื่อง Operator's manual cobas 6000 analyzer series (MN-LAB-065)
- 21.3 ใบแทรกสารเทียบ Calibrator f.a.s. (PI-LAB-110)
- 21.4 ระเบียบปฏิบัติงานเรื่องการจัดการกระบวนการทดสอบ (WP-LAB-20)
- 21.5 ระเบียบปฏิบัติงานเรื่องการสร้างเชื่อมั่นในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21)

22. ภาคผนวก



ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-019 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
11 พ.ย.62	0	ฉบับแรก	นายสิปปนนท์ฯ
1 พ.ย. 63	1	แก้ไขทั้งฉบับ	นายสิปปนนท์ฯ
1 ก.ย. 64	1	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข	นายสิปปนนท์
1 ก.ย.65	2	แก้ไขข้อ 7.5 สารวัสดุควบคุมคุณภาพ ยกเลิก หัวข้อ 7.5.1 แก้ไขข้อ 11 ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ ยกเลิก ข้อ 11.1.2, 11.1.7 และ 11.2.5.2 แก้ไขข้อ 21 เอกสารอ้างอิง ยกเลิกข้อ 21.4	นายสิปปนนท์
1 ก.พ. 66	2	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข	นายสิปปนนท์



แผนกพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง

การตรวจ ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT)

WI-LAB-019

แก้ไขครั้งที่.....

ผู้จัดทำ

(นายสิปปนนท์ ศรีวะระมย์)

ผู้จัดการวิชาการเคมีคลินิก

...../...../.....

ผู้ทบทวน

ร.ท.หญิง

(อรกัญญา ทรงทอง)

ผู้จัดการคุณภาพ

...../...../.....

ผู้อนุมัติ

พ.อ.

(ฉัตรมงคล คนขยัน)

หัวหน้าห้องปฏิบัติการ

...../...../.....

วันที่ประกาศใช้: