แผนกพยาธิวิทยา

โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน

เรื่อง

การตรวจ Total protein

WI-LAB-014

แก้ไขครั้งที่ 00

ผู้จัดทำ สิปปนนท์

(นายสิปปนนท์ ศรีวะรมย์)

ผู้จัดการวิชาการสาขาเคมีคลินิก

11 พฤศจิกายน 2562

ผู้ทบทวน ร.ต.หญิง อรกัญญา

(อรกัญญา ทรงทอง)

ผู้จัดการคุณภาพ

11 พฤศจิกายน 2562

ผู้อนุมัติ พ.อ.

(ฉัตรมงคล คนขยัน)

หัวหน้าห้องปฏิบัติการ

11 พฤศจิกายน 2562

วันที่ประกาศใช้: 11 พฤศจิกายน 2562

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ (purpose of examination)

1.1 บ่งชี้ถึงสภาวะการทำงานของตับหรือของโรคเกี่ยวกับตับ

1.2 ตรวจติดตามและดูการตอบสนองต่อการรักษาโรคเกี่ยวกับตับ

1.3 ประเมิน nutritional status

1.4 Investigate edema

1.5 Severe organ diseases especially protein losing state

1.6 Immunological diseases

1.7 บ่งชี้ถึงสภาวะการทำงานของไต

1.8 ใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรคเกี่ยวกับไขกระดูก เช่น Multiple myeloma

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

2.1 ใช้ modification of the biuret reaction ทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Dimension® EXL™ 200 Integrated Chemistry System ร่วมกับน้ำยา TP Flex® reagent cartridge และสารเทียบ Total Protein/Albumin Calibrator ซึ่งทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์จากผู้ผลิตเดียวกัน

2.2 อาศัยหลักการ bichromatic (540, 700 nm) endpoint technique โดย Cupric ion (Cu^{2+}) ในสารประกอบเชิงซ้อนที่เรียกว่า biuret จะทำปฏิกิริยากับพันธะ peptide ของโปรตีนในสารละลายด่าง ก่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงของ protein-biuret มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 540 และ 700 นาโนเมตร

$$Cu^{++} + \text{Protein} \xrightarrow[\text{(absorbs at 540 nm)}]{OH-} \text{complex}$$

3. ลักษณะทางประสิทธิภาพ (performance characteristics)

มีระบุไว้ในใบแทรกน้ำยา TP Flex® reagent cartridge (PI-LAB-014) ในหัวข้อ Specific Performance Characteristics ดังนี้

Specific Performance Characteristics[f]

Precision[g]

Material	Mean g/dL [g/L]	Standard Deviation (% CV) Within-run	Total
Multiqual® Chemistry Control			
Normal	6.06 [61]	0.04 [0.4] (0.7)	0.09 [0.9] (1.5)
Abnormal	4.64 [46]	0.05 [0.5] (1.1)	0.10 [1.0] (2.2)
Moni-Trol®[h]			
Level 1	7.34 [73]	0.04 [0.4] (0.6)	0.06 [0.6] (0.8)
Level 2	4.80 [48]	0.05 [0.5] (0.9)	0.07 [0.7] (1.4)

f. All specific performance characteristics tests were run after normal recommended equipment quality control checks were performed (refer to your Dimension® Operator's Guide).
g. Specimens at each level were analyzed in triplicate for 20 runs. The within-run and total standard deviations were calculated by the analysis of variance method.
h. Using reduced sample size (10 µL).

Multiqual® Chemistry Control is a registered trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. Irvine, CA 92618.
Moni-Trol® is a registered trademark of Medical Analysis Systems Inc., Camarillo, CA 93012-8058.

Method Comparison

Regression Statistics

Comparative Method	Slope	Intercept g/dL [g/L]	Correlation Coefficient	n
TP Method on the aca® discrete clinical analyzer[i]	0.984	0.04 [0.4]	0.966	60[j]
Serum TP method on the Dimension® vs. plasma	0.982	0.37 [4.9]	0.9877	52[k]
Reduced vs. Standard sample size[l]	0.975	0.12 [1.2]	0.996	60[m]

i. Model equation for regression statistics is: Results of Dimension® TP system = [slope x (comparative method results)] + intercept.
j. Range of Samples: 2.8 – 8.8 g/dL [28 – 88 g/L].
k. Range of Samples: 3.0 – 11.6 g/dL [30 – 116 g/L].
l. Model equation for regression statistics is: Results of Dimension® TP system using reduced sample size (10 µL) = [slope x Results of Dimension® TP system using standard sample size (15 µL)] + intercept.
m. Range of samples: 3.9 – 9.7 g/dL [39 – 97 g/L].

Specificity

HIL Interference

The TP method (using the standard sample size of 15 µL) was evaluated for interference from hemolysis, icterus and lipemia according to CLSI/NCCLS EP7-P. Bias, defined as the difference between the control sample (does not contain interferent) and the test sample (contains the interferent), is shown in the table below. Bias exceeding 10% is considered "interference".

Substance Tested	Test Concentration SI Units	TP Concentration g/dL [g/L]	Bias* %
Hemoglobin (hemolysate)	300 mg/dL [0.19 mmol/L] (monomer)	3.9 [39]	<10
Bilirubin (unconjugated)	5 mg/dL [86 µmol/L]	3.8 [38]	<10
Lipemia (Intralipid®)	200 mg/dL [2.26 mmol/L]	3.9 [39]	<10
	600 mg/dL [6.78 mmol/L]	3.9 [39]	n

The TP method (using the reduced sample size of 10 µL) was evaluated for interference from hemolysis, icterus and lipemia according to CLSI/NCCLS EP7-P. Bias, defined as the difference between the control sample (does not contain interferent) and the test sample (contains the interferent), is shown in the table below. Bias exceeding 10% is considered "interference".

Substance Tested	Test Concentration SI units	TP Concentration g/dL [g/L]	Bias %
Hemoglobin (hemolysate)	200 mg/dL [0.12 mmol/L] (monomer)	3.2 [32]	<10
Bilirubin (unconjugated)	5 mg/dL [86 µmol/L]	3.2 [32]	<10
Lipemia (Intralipid®)	200 mg/dL [2.26 mmol/L]	3.1 [31]	<10
	600 mg/dL [6.78 mmol/L]	3.2 [32]	n

n. The interference testing at this level tripped a test report message; therefore the magnitude of the interference could not be determined.

* Analyte results should not be corrected based on this bias.

4. ชนิดตัวอย่าง (type of sample)

4.1 ชนิดตัวอย่างเริ่มต้น (primary sample) ได้แก่ เลือด (blood) ประมาณ 2 ml. หรือตามข้อกำหนดของแต่ละภาชนะบรรจุที่เลือกใช้

4.2 ชนิดตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ (analytical sample) ได้แก่ plasma, serum ปริมาณขั้นต่ำที่ต้องการใช้ (dead volume) ประมาณ 200 ไมโครลิตร (กรณีบรรจุใน small sample cup), 250 ไมโครลิตร (กรณีบรรจุใน sample cup) และ 1.5 mL (สำหรับการบรรจุใน sample tube ขนาด 13x75 mm.) แต่ปริมาตรที่ใช้ตรวจวิเคราะห์จริงครั้งละเท่ากับ 15 ไมโครลิตร

5. การเตรียมผู้ป่วย (patient preparation)

ไม่มี

6. ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง (type of container and additives)

6.1 Clot blood

6.2 EDTA tube

6.3 Lithium heparin tube

6.4 Potassium oxalate tube

6.5 Sodium fluoride tube

7. เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี (required equipment and reagents)

7.1 เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ : Dimension® EXL™ 200 Integrated Chemistry System

7.2 น้ำยาตรวจวิเคราะห์ : TP Flex® reagent cartridge, Cat. No. DF73

7.3 สารมาตรฐานสำหรับสอบเทียบ Total protein : Total Protein/Albumin Calibrator, Cat. No. DC31

7.4 สารควบคุมคุณภาพที่ทราบความเข้มข้น Total protein 3 ระดับ จากแหล่งที่ไม่ใช่ผู้ผลิตเครื่องมือ/น้ำยา ได้แก่ Liquid Assayed and Unassayed Multiqual®

7.5 Auto pipette, Volumetric pipette และ Pipette tip

7.6 Distilled water

7.7 ภาชนะที่จะใช้บรรจุตัวอย่างตรวจที่แบ่งมา ได้แก่ Sample cup, Small sample cup, Plastic plain tube

7.8 sample segment

8. สิ่งแวดล้อมและการควบคุมความปลอดภัย (environmental and safety controls)

8.1 ต้องสวมถุงมือยางและเสื้อคลุมขณะปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการติดเชื้อบางชนิดที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่างตรวจ

8.2 น้ำยามีส่วนผสมของสารถนอมรักษาส่วนประกอบของน้ำยา ไม่ควรกลืนกินหรือสัมผัสกับผิวหนังโดยตรง

8.3 Flex น้ำยาที่ตรวจเสร็จแล้วให้ทิ้งในถังขยะเคมี

9. ขั้นตอนการสอบเทียบ(calibration procedures)

ขั้นตอนการสอบเทียบให้ดำเนินการตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือปฏิบัติงาน Standard Operating Procedure for Dimension EXL 200 Clinical Chemistry System (MN-LAB-002)

9.1 ใช้สารเทียบ Total Protein/Albumin Calibrator, Cat. No. DC31 ซึ่งมีระดับค่า Total Protein สอบกลับ (Traceability) ถึง NIST SRM 927

9.2 บันทึกข้อมูลของสารเทียบ (Calibration Reference material or Calibrator)แต่ละรุ่นที่ผลิต(lot number) ลงในพารามิเตอร์ของการสอบเทียบในเครื่องโดยการอ่าน QR code ที่ให้มาพร้อมกับใบแทรกสารเทียบ Total Protein/Albumin Calibrator (PI-LAB-120)

9.3 การเตรียมและการเก็บรักษาสารเทียบ ให้ปฏิบัติตามวิธีการที่ระบุไว้ในใบแทรกสารเทียบ Total Protein/Albumin Calibrator (PI-LAB-120)

9.4 ทำการสอบเทียบ(calibration) ทุก 90 วัน และเมื่อเปลี่ยนน้ำยา Lot. ใหม่ โดยใช้สารเทียบจำนวน 3 ระดับ ทำซ้ำระดับละ 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

9.5 ให้ทำการสอบเทียบซ้ำ(re-calibration) เมื่อมีการทำ preventive maintenance รอบใหญ่หรือมีการเปลี่ยนชิ้นส่วนอะไหล่ที่มีผลกระทบต่อค่าการวัด และเมื่อผล IQC และหรือ EQAS บ่งชี้ว่ามี systematic error

10. ขั้นตอนของกระบวนงาน (procedural steps)

10.1 เตรียมน้ำยา (reagent preparation)

10.1.1 นำน้ำยา TP Flex® reagent cartridge ออกจากตู้เย็น ซึ่งเป็นน้ำยาพร้อมใช้งาน (Ready to use) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C ได้จนถึงวันหมดอายุที่ระบุข้าง Flex น้ำยา

10.1.2 ฉีกบรรจุภัณฑ์น้ำยา TP Flex® reagent cartridge ออกจากห่อ ซึ่งมีขนาดบรรจุ 120 tests/Flex

10.1.3 เขียนวันเปิดใช้บน Flex น้ำยาก่อนนำเข้าเครื่อง และลงบันทึกการเปิดใช้น้ำยาแต่ละกล่องในแบบบันทึกการนำออกมาใช้งานน้ำยา สารมาตรฐาน วัสดุอ้างอิง สารควบคุม และสิ่งอุปกรณ์อื่นๆ (FM-LAB- 187)

10.1.4 นำ Flex น้ำยาใส่เครื่อง โดยเครื่องจะเริ่มนับอายุของน้ำยาถอยหลังจนถึงวันหมดอายุที่กำหนดไว้ในโปรแกรมของระบบเครื่องมือ ซึ่งน้ำยาทุกหลุมตั้งแต่หลุมที่ 1-6 ใน Flex ที่ปิดสนิทจะมีอายุการใช้งานบนเครื่อง (expired on board) 30 วัน ส่วนน้ำยาในหลุมที่ถูกเจาะใช้งานแล้วจะมีอายุการใช้งาน 5 วัน

10.1.5 พารามิเตอร์ของน้ำยามีพร้อมใช้งานในเครื่องตามที่ระบุไว้ในใบแทรกน้ำยา TP Flex® reagent cartridge (PI-LAB-014)

10.2 สอบเทียบ(Calibration) ตามข้อ 9.

10.3 ตรวจสอบความถูกต้องของการใส่ภาชนะบรรจุตัวอย่างลงไปใน Sample segment โดยเลือกชนิดของภาชนะบรรจุตัวอย่างให้ตรงกับชนิดของ Sample segment โดยเฉพาะ Primary tube แต่ละขนาดต้องวางให้ตรงกับสีของ adaptor ใน sample segment

10.4 ตรวจสอบความความเพียงพอของการบรรจุตัวอย่างตามชนิดภาชนะบรรจุ ได้แก่ Small sample cup (ควรบรรจุ 0.20-1 mL), sample cup(ควรบรรจุ 0.25-1.5 mL) เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนของการดูดตัวอย่างตรวจจากการกระแทกก้น cup และกรณีใช้ Primary tube(ขนาดบรรจุ 5, 7 และ 10 mL ควรบรรจุตัวอย่างตรวจให้มีปริมาตรรวมทั้งหมดสูงจากก้นหลอดเกิน 3 cm.)

10.5 กรณีที่ใช้ primary tube ขนาด 13x75 mm. บรรจุตัวอย่างไม่มี barcode และมีปริมาตรสิ่งส่งตรวจรวมทั้งหมดแล้วน้อยกว่า 1.5 mL ควรเปลี่ยนภาชนะที่ใช้บรรจุสิ่งส่งตรวจเป็น sample cup หรือ Small sample cup (SSC) แล้วเปลี่ยน Mode เลือกชนิดภาชนะให้ตรงกับชนิดของภาชนะบรรจุตัวอย่างที่ใช้

10.6 กรณีที่ใช้ primary tube ขนาด 13x75 mm. บรรจุตัวอย่างมี barcode และมีปริมาณสิ่งส่งตรวจน้อยกว่า 1.5 mL ควรเปลี่ยนภาชนะที่ใช้บรรจุสิ่งส่งตรวจเป็น Small sample cup(SSC) และเลือกใช้ Sample segment ที่ถูกกำหนดให้ใช้กับ SSC ไว้แล้วใน System Configuration Menu ของเครื่องวิเคราะห์

10.7 ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ ตามวิธีการในข้อ 11.

10.8 ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผู้ป่วย ตามวิธีการที่ระบุไว้ในข้อ 10.7 ของคู่มือปฏิบัติงานเรื่องStandard Operating Procedure for Dimension EXL 200 Clinical Chemistry System (MN-LAB-002)

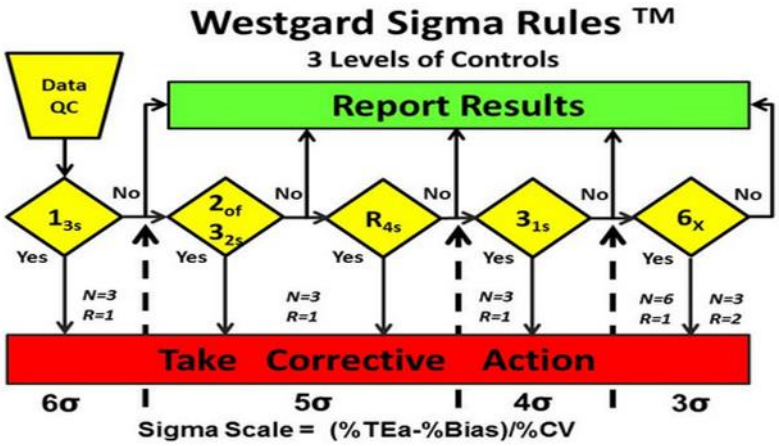
10.9 ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผู้ป่วยนั้น ถ้าโปรแกรม LIS เชื่อมต่อกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อย่างสมบูรณ์ เมื่อใส่ตัวอย่างซึ่งติดฉลากด้วย barcode sticker ลงไปใน sample segment นำไปวางลงที่ sample tray แล้วกดปุ่ม run เครื่องตรวจวิเคราะห์จะทำการตรวจวิเคราะห์ และส่งผลวิเคราะห์ไปบันทึกในโปรแกรม LIS อย่างอัตโนมัติ

11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ (quality control procedures)

การควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (Internal Quality Control, IQC) ให้ดำเนินการตามระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21) โดยมีข้อกำหนดและเกณฑ์คุณภาพที่สำคัญ ดังนี้

11.1 ใช้ Sigma metric เป็น QC planning tool

11.2 ใช้สารควบคุมคุณภาพ Liquid Assayed and Unassayed Multiqual® ตรวจวิเคราะห์ทั้ง 3 ระดับพร้อมกันอย่างน้อยวันละ 1 ครั้งในช่วงเวลาตอนเช้าของแต่ละวันทุกวันก่อนตรวจตัวอย่างผู้ป่วย (N=3, R=1 หมายถึง ความถี่ 1 ครั้งใน 24 ชั่วโมง) แต่ถ้า Performance ของการตรวจ Total Protein ระดับ Sigma metric น้อยกว่า 4.0 ควรเพิ่มความถี่ในการทำ IQC เป็นวันละ 2 ครั้ง(N=3, R=2 ในที่นี้หมายถึงทำตอนเช้า 1 ครั้ง และตอนบ่าย 1 ครั้ง)



11.3 ก่อนใช้งานสารควบคุมคุณภาพต้องตรวจสอบสภาพของสารควบคุมคุณภาพที่เปิดใช้งานอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ตรวจสอบในวันแรกที่เปิดใช้งาน ครั้งที่ 2 ตรวจสอบช่วงระหว่างที่เก็บรักษา(วันที่ 3-4 หลังวันเปิดใช้งาน) ครั้งที่ 3 ตรวจสอบในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาที่ใช้งานหมด พร้อมลงบันทึกผล

การตรวจสอบในแบบบันทึกตรวจสอบสภาพของวัสดุควบคุมคุณภาพ(FM-LAB-311)

11.4 ใช้ค่า Allowable total error(TEa) ของการทดสอบ Total Protein = ± 8% (อ้างอิงจาก CLIA2019)

11.5 ติดตามค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของการทดสอบระหว่างวัน (between-day imprecision, % CV_{bd}) และ total CV โดยใช้เกณฑ์ที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 2.67%

11.6 ติดตามตรวจสอบผล IQC ของการทดสอบ Total Protein ด้วยกฎการควบคุมคุณภาพ(control rule) ตาม QC procedure ที่กำหนดไว้อย่างสม่ำเสมอต่อเนื่องด้วยข้อมูลที่เป็นกราฟในเมนู Process Control /Method Review ของเครื่อง Dimension® EXL™ 200 Integrated Chemistry System (EXL200-LAB-003) หรือติดตามตรวจสอบผล IQC ได้ในโปรแกรม Bio-Rad's Unity Real Time(URT-LAB-001)

11.7 เมื่อผลการทำ IQC มีการละเมิดกฎการควบคุมคุณภาพ (out of control) และผลการทดสอบมีแนวโน้มที่จะผิดพลาดทางคลินิกอย่างมีนัยสำคัญให้งดออกผลการตรวจตัวอย่างผู้ป่วย ดำเนินการแก้ไขและทวนสอบลักษณะประสิทธิภาพ ลงบันทึกปฏิบัติการแก้ไขและมาตรการป้องกันที่ทำไปในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล IQC ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-025)

12. ขั้นตอนการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparisons)

การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparisons) ให้ดำเนินการตามระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21) โดยมีข้อกำหนดและเกณฑ์คุณภาพที่สำคัญ ดังนี้

12.1 ห้องปฏิบัติการเข้าร่วม EQAS Clinical Chemistry(Monthly) Program ซึ่งให้บริการโดย BIO-RAD มีกำหนดการสมัครสมาชิกปีละ 1 ครั้ง ควรสมัครสมาชิกในห้วงไม่เกินเดือนมิถุนายนของทุกปี ความถี่ในการประเมินเดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-มิถุนายน รวม 12 ครั้ง/ปี

12.2 บุคลากรห้องปฏิบัติการดำเนินการตรวจตัวอย่างจากโปรแกรม EQAS พร้อมกันไปกับการตรวจตัวอย่างผู้ป่วยในงานประจำวันไม่เกินวันกำหนดส่งรายงานที่ระบุไว้บนฉลากข้างขวดบรรจุตัวอย่าง 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 เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อหารือกันเมื่อผลการประเมินไม่เป็นไปตามเกณฑ์หรือเป้าหมายที่กำหนด และบันทึกมาตรการแก้ไข/ป้องกัน ในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล EQA ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-020)

13. สิ่งรบกวน (interferences)

13.1 Dextran 40 ที่ระดับความเข้มข้น 1500 mg/dL [375 µmol/L] รบกวนการตรวจวัดที่ระดับ TP 7.0 g/dL [70 g/L] ทำให้ค่าสูงขึ้น 17%

13.2 Immunoglobulin G ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 g/dL [25 g/L] รบกวนการตรวจวัดที่ระดับ TP 7.0 g/dL [70 g/L] ทำให้ค่าสูงขึ้น 25%

13.3 Hemoglobin (hemolysate) ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/dL [0.31 mmol/L] รบกวนการตรวจวัดที่ระดับ TP 3.9 g/dL [39 g/L] ทำให้ค่าสูงขึ้น 11%

13.4 Bilirubin (unconjugated) ที่ระดับความเข้มข้น 20 mg/dL [342 mmol/L] รบกวนการตรวจวัดที่ระดับ TP 3.8 g/dL [38 g/L] ทำให้ค่าต่ำลง 11%

13.5 Lipemia (Intralipid®)) ที่ระดับความเข้มข้น 600 mg/dL [6.78 mmol/L] หรือมากกว่าจะรบกวนการตรวจวัด

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

14.1 เครื่องจะรายงานผลการตรวจ Total Protein ในหน่วย g/dL [g/L]

14.2 การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ให้ดำเนินการตามระเบียบปฏิบัติงานเรื่อง การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (WP-LAB-17)

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

6.4 – 8.2 g/dL [64 – 82 g/L]

16. ช่วงที่รายงานผลการทดสอบได้(reportable interval of examination results)

Analytical Measurement Range (AMR): 2.0 – 12.0 g/dL [20 – 120 g/L]

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

ถ้าผลการทดสอบ total protein > 12.0 g/dL [120 g/L] สามารถทำการเจือจางตัวอย่างเองโดยผู้ตรวจวิเคราะห์(manual dilution) ให้เจือจางตัวอย่างด้วย Reagent grade water (RGW) เช่น ถ้าเจือจางตัวอย่างเป็น 1:5 ใช้ตัวอย่าง 1 ส่วน ผสมกับ RGW 4 ส่วน) ให้กำหนดค่า dilution factor = 5 ในเครื่องตรวจวิเคราะห์เพื่อให้โปรแกรมในระบบเครื่องมือคำนวณค่าให้หรืออาจเลือกใช้วิธีไม่ต้องกำหนดค่า dilution factor ในเครื่องตรวจวิเคราะห์ แต่ผู้ตรวจวิเคราะห์ต้องคำนวณค่าเองโดยใช้ค่าที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่เจือจางเป็น 1:5 แล้วคูณด้วย dilution factor = 5 เป็นต้น

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

-

19. การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ (laboratory clinical interpretation)

19.1 ค่า total protein ที่ต่ำกว่าปกติ อาจเกิดจาก

19.1.1 ขาดสารอาหารโดยเฉพาะโปรตีนหรือมีโปรตีนน้อยมาก

19.1.2 กลไกการดูดซึมของลำไส้ทำงานผิดปกติ (Malabsorption)

19.1.3 ตับทำงานผิดปกติ

19.1.4 โรคไต Nephrosis , Nephrotic syndrome

19.1.5 เกิดจากโรคในช่องทางเดินอาหาร

19.1.6 โรคเบาหวาน

19.1.7 โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของเลือด (Blood dyscrasias) เช่น มีเลือดกำเดาไหลโดยไม่มีสาเหตุ

19.1.8 เสียเลือดหรือตกเลือดที่อวัยวะใดอวัยวะหนึ่งในร่างกาย (Hemorrhage) เช่น ริดสีดวงทวาร

19.1.9 มีอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายเกิดแผลขนาดใหญ่จากไฟลวก

19.1.10 เกิดพิษจากการตั้งครรภ์

19.2 ค่า total protein ที่สูงกว่าปกติ อาจเกิดจาก

19.2.1 ตับอาจเกิดการอักเสบหรือมีการติดเชื้อเรื้อรัง เช่น จากเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือซี เชื้อ HIV

19.2.2 ภาวะขาดน้ำ (Dehydration)

19.2.3 เสียน้ำจากการอาเจียน อาการท้องเดิน ฯลฯ

19.2.4 สภาวะความเป็นกรดจากอาการของโรคเบาหวาน (Diabetic acidosis)

19.2.5 โรคมะเร็งไขกระดูก (Multiple myeloma)

19.2.6 โรคทางพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า “Waldenstrom’s disease” ซึ่งเป็นมะเร็งของ B-cell lymphocyte ทำให้ไขกระดูกต้องการใช้โปรตีนนำมาสร้างเซลล์มะเร็งชนิดนี้มากเกินไป

20. แหล่งที่มาของค่าแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น (potential sources of variation)

20.1 น้ำยา (Reagent)

20.1.1 เสื่อมสภาพจากการเก็บรักษาไม่ถูกต้องหรือหมดอายุ

20.1.2 เปลี่ยน lot ใหม่, เปลี่ยน Flex reagent cartridge อันใหม่

20.1.3 มีฟองอากาศ ปริมาตรไม่เพียงพอ

20.2 วัสดุสอบเทียบ (Calibrator)

20.2.1 เทคนิคการละลาย เช่น ละลายผิดสัดส่วน, เทคนิคในการเตรียมผิดพลาด(การ pipette, ระยะเวลาในการละลายสั้นหรือยาวเกินไป ควรใช้ระยะเวลาในการละลายประมาณ 40 นาที โดยใช้เทคนิคตามคำแนะนำของผู้ผลิต), การละลายให้ได้อุณหภูมิห้อง(freeze-thaw)ใช้เวลานานเกินไปหรือเร็วเกินไป, ตัวทำละลายสกปรก(ควรใช้ Purified Water Diluents หรือ reagent grade water), ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันเนื่องจากผสมให้เข้ากันไม่ดีตั้งแต่ขั้นตอนกาเตรียมไปจนถึงการผสมให้เข้ากันไม่ดีก่อนการตรวจวัดค่าของ calibrator

20.2.2 มีการระเหยเนื่องจากการบรรจุ calibrator ปริมาณน้อยใน sample cup ร่วมกับการตั้งทิ้งไว้นาน หรือนำ Calibrator ที่เหลือซึ่งผ่านการใช้แล้วมาใช้สอบเทียบซ้ำอีก

20.2.3 เปลี่ยน lot ใหม่

20.2.4 เสื่อมสภาพหรือหมดอายุ

20.2.5 มีฟองอากาศ

20.2.6 ใช้ Blank ไม่เหมาะสม

20.3 เครื่องมือ (Analyzer)

20.3.1 แหล่งกำเนิดแสง (source lamp) เสื่อมตามอายุการใช้งาน (ควรเปลี่ยนทุกๆ 6 เดือน)

20.3.2 ท่อนำส่งน้ำยาที่ต่อเชื่อมกับ reagent probe อุดตัน ตีบ ขาดความยืดหยุ่น

20.3.3 Windows สกปรก

20.3.4 Probe สกปรก

20.3.5 กระแสไฟฟ้าไม่คงที่

20.3.6 เลยเวลา Calibration (วงรอบการทำไม่เกิน 90 วัน)

20.3.7 Measurement syringe รั่ว/เสื่อม

20.3.8 หลังการทำ preventive maintenance ครั้งใหญ่ หรือเปลี่ยนอะไหล่ใหม่ เช่น source Lamp, reagent probe, sample probe แล้วไม่ได้ calibration ใหม่

20.3.9 ทำ maintenance check หรือทำ preventive maintenance เลยวงรอบหรือไม่ทำตามเงื่อนไขคำแนะนำที่ผู้ผลิตเครื่องมือกำหนด

20.4 ตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ (Sample)

20.4.1 ตัวอย่างมีการ clot ในระหว่างการตรวจวิเคราะห์ในเครื่องวิเคราะห์

20.4.2 ตัวอย่างมีการระเหยเนื่องจากตั้งทิ้งไว้นานเกินไปก่อนถูก sample probe ดูดไปตรวจวิเคราะห์ โดยเฉพาะกรณีที่มีการแบ่งตัวอย่างปริมาณน้อยใส่ sample cup/small sample cup

21. เอกสารอ้างอิง(references)

21.1 ใบแทรกน้ำยา TP Flex® reagent cartridge (PI-LAB-014)

21.2 SOP For Dimension EXL 200 Clinical Chemistry System (MN-LAB-002)

21.3 ใบแทรกสารเทียบ Total Protein/Albumin Calibrator (PI-LAB-120)

21.4 Dimension® EXL™ 200 integrated chemistry system Operator’s Guide (MN-LAB-007)

21.5 ใบแทรกสารควบคุมคุณภาพ Liquid Assayed and Unassayed Multiqual® (PI-LAB-130)

21.6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (WP-LAB-17)

21.7 ระเบียบปฏิบัติงานเรื่องการสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการวิเคราะห์ (WP-LAB-21)

22. ภาคผนวก

22.1 ใบแทรกน้ำยา TP Flex® reagent cartridge (PI-LAB-014)

SIEMENS

REF DF73

PI-LAB-014/00(01/10/2560)

Dimension® clinical chemistry system

Flex® reagent cartridge — TP

See shaded sections: Updated information from 2003-04 version.

Issue Date 2008-04-23

Total Protein

Intended Use: The TP method used on the Dimension® clinical chemistry system is an *in vitro* diagnostic test intended for the quantitative determination of total protein in human serum and heparinized plasma. Measurements of total protein are used in the diagnosis and treatment of a variety of diseases involving the liver, kidney or bone marrow as well as metabolic or nutritional disorders.

Summary: The total protein method is a modification of the biuret reaction first introduced by Kingsley[1] and later modified by Henry[2] and presented as the method of choice for serum by Henry.[3] This method incorporates tartrate as a complexing agent to prevent precipitation of $Cu(OH)_2$. Serum blanking increases method sensitivity and minimizes spectral interference from lipemia.

Principles of Procedure: Cupric ion (Cu^{++}) reacts with the peptide linkages (-C-NH-CH-C-NH-) of protein in a basic solution.

```
                  ||     |  ||
                  O      R  O
```

The blue copper (II) protein complex thus formed is proportional to the total protein concentration in the sample and is measured using a bichromatic (540, 700 nm) endpoint technique.

$$Cu^{++} + \text{Protein} \xrightarrow[\text{(absorbs at 540 nm)}]{OH^-} \text{complex}$$

Reagents

Wells[a]	Form	Ingredient	Concentration[b]
1 – 3	Liquid	Potassium Sodium Tartrate NaOH	1.089 g/mL
4 – 6	Liquid	Cupric Sulfate	0.015 mol/L

a. Wells are numbered consecutively from the wide end of the cartridge.
b. Nominal value per test at manufacture.

Risk and Safety:
R52/53: Harmful to aquatic organisms; may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

Safety data sheets (MSDS/SDS) available on www.siemens.com/diagnostics

Precautions: Used cuvettes contain human body fluids; handle with appropriate care to avoid skin contact and ingestion.

For *in vitro* diagnostic use

Reagent Preparation: All reagents are liquid and ready to use.

Store at: 2 – 8 °C

Expiration: Refer to shelf carton for expiration date of individual unopened reagent cartridges. Sealed cartridge wells on the instrument are stable for 30 days.

Open Well Stability: 5 days for wells 1 – 6

Specimen Collection and Handling: Serum and plasma can be collected using recommended procedures for collection of diagnostic blood specimens by venipuncture.[4,5]

Follow the instructions provided with your specimen collection device for use and processing.[6]

Complete clot formation should take place before centrifugation.[7]

Specimens should be free of particulate matter.

Separated specimens are stable for 8 hours at room temperature, 72 hours at 2 – 8 °C and 6 months when frozen at -20 °C or colder.[7,8]

Corvac® and SST® collection tubes do not affect the TP method.

Blood collection tubes containing EDTA, lithium heparin, potassium oxalate or sodium fluoride do not affect the TP method.

Corvac® is a registered trademark of Monoject, Division of Sherwood Medical, St. Louis, MO.
SST® is a registered trademark of Becton-Dickinson, Rutherford, NJ.

Procedure

Materials Provided

TP Flex® reagent cartridge, Cat. No. DF73

Materials Required But Not Provided

Total Protein/Albumin Calibrator, Cat. No. DC31
Quality Control Materials

Test Steps

Sampling,[c] reagent delivery, mixing, processing, and printing of results are automatically performed by the Dimension® system. For details of this processing, refer to your Dimension® Operator's Guide.

c. The sample container (if not a primary tube) must contain sufficient quantity to accommodate the sample volume plus dead volume. Precise container filling is not required.

Test Conditions

Sample Size	15 µL, (10 µL)[d]
Reagent 1 Volume	85 µL
Reagent 2 Volume	85 µL
Diluent Volume	315 µL
Temperature	37 °C
Wavelength	540 and 700 nm
Type of Measurement	Bichromatic endpoint

d. An alternate sample size (10 µL) can be programmed; refer to the Operator's Guide for the use of alternate sample size.

Calibration

Assay Range	2.0 – 12.0 g/dL [20 – 120 g/L][e]
Calibration Material	Total Protein/Albumin Calibrator, Cat. No. DC31
Calibration Scheme	3 levels, n = 3
Units	g/dL [g/L] (g/dL x 10) = [g/L]
Typical Calibration Levels	2.0, 6.0, 10.0 g/dL [20, 60, 100 g/L]
Calibration Frequency	Every 3 months for any one lot
A new calibration is required	• For each new lot of Flex® reagent cartridges • After major maintenance or service, if indicated by quality control results • As indicated in laboratory quality control procedures • When required by government regulations
Assigned Coefficients	Standard sample size = 15 µL C_0 3.700 C_1 0.0222 Alternate sample size = 10 µL C_0 5.357 C_1 0.031

e. Système International d'Unités [SI Units] are in brackets.

Quality Control

At least once each day of use, analyze two levels of a Quality Control (QC) material with known total protein concentrations.

Follow your laboratory internal QC procedures if the results obtained are outside acceptable limits.

Results: The instrument automatically calculates and prints the concentration of total protein in g/dL [g/L] using the calculation scheme illustrated in your Dimension® Operator's Guide.

Results of this test should always be interpreted in conjunction with the patient's medical history, clinical presentation and other findings.

Analytical Measurement Range (AMR): 2.0 – 12.0 g/dL [20 – 120 g/L]
This is the range of analyte values that can be directly measured on the specimen without any dilution or pretreatment that is not part of the usual analytical process and is equivalent to the assay range.

Samples with results in excess of 12.0 g/dL [120 g/L] should be repeated on dilution.

Manual Dilution: Make appropriate dilution with Reagent grade water to obtain result within the assay range. Enter dilution factor.

Reassay. Resulting readout is corrected for dilution.

Autodilution (AD): Refer to your Dimension® Operator's Guide.

Results less than 2.0 g/dL [20 g/L] should be reported as "less than 2.0 g/dL [20 g/L]" instead of the numerical value.

Limitations of Procedure

The instrument reporting system contains error messages to warn the operator of specific malfunctions. Any report slip containing such error messages should be held for follow-up. Refer to your Dimension® Operator's Guide.

A system malfunction may exist if the following 5-test precision is observed at the standard sample size (15 µL):

Concentration	SD
6.8 g/dL [68 g/L]	>0.12 g/dL [1.2 g/L]

Interfering Substances

Dextran 40 of 1500 mg/dL [375 µmol/L] increases a TP result of 7.0 g/dL [70 g/L] by 17%.
Immunoglobulin G of 2.5 g/dL [25 g/L] increases a TP result of 7.0 g/dL [70 g/L] by 25%.

Using standard sample size (15 µL):
Hemoglobin (hemolysate) of 500 mg/dL [0.31 mmol/L] (monomer) increases a TP result of 3.9 g/dL [39 g/L] by 11%.
Bilirubin (unconjugated) of 20 mg/dL [342 µmol/L] decreases a TP result of 3.8 mg/dL [38 g/L] by -11%.
Lipemia (Intralipid®) of 600 mg/dL [6.78 mmol/L] and above tripped an error flag on this method, so the magnitude of the interference is not available.

For reduced sample size (10 µL):
Hemoglobin (hemolysate) of 300 mg/dL [0.19 mmol/L] (monomer) increases a TP result of 3.2 g/dL [32 g/L] by 11%.
Bilirubin (unconjugated) of 20 mg/dL [342 µmol/L] decreases a TP result of 3.2 mg/dL [32 g/L] by -13%.
Lipemia (Intralipid®) of 600 mg/dL [6.78 mmol/L] and above tripped an error flag on this method, so the magnitude of the interference is not available.

Intralipid® is a registered trademark of Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany.

Expected Values[6]: 6.4 – 8.2 g/dL [64 – 82 g/L]

This reference population consisted of the following:

118 males, ages 20 – 65
108 females, ages 20 – 65

The reference interval was calculated non-parametrically and represents the central 95% of the population, using serum as the sample.

A reference interval for plasma would be 0.3 g/dL higher due to the presence of fibrinogen in the plasma.

Each laboratory should establish its own reference interval for total protein as performed on the Dimension® system.

Specific Performance Characteristics[f]

Precision[g]

Material	Mean g/dL [g/L]	Standard Deviation (% CV) Within-run	Total
Multiqual® Chemistry Control			
Normal	6.06 [61]	0.04 [0.4] (0.7)	0.09 [0.9] (1.5)
Abnormal	4.64 [46]	0.05 [0.5] (1.1)	0.10 [1.0] (2.2)
Moni-Trol®[h]			
Level 1	7.34 [73]	0.04 [0.4] (0.6)	0.06 [0.6] (0.8)
Level 2	4.80 [48]	0.05 [0.5] (0.9)	0.07 [0.7] (1.4)

f. All specific performance characteristics tests were run after normal recommended equipment quality control checks were performed (refer to your Dimension® Operator's Guide).
g. Specimens at each level were analyzed in triplicate for 20 runs. The within-run and total standard deviations were calculated by the analysis of variance method.
h. Using reduced sample size (10 µL).

Multiqual® Chemistry Control is a registered trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. Irvine, CA 92618.
Moni-Trol® is a registered trademark of Medical Analysis Systems Inc., Camarillo, CA 93012-8058.

Method Comparison

Regression Statistics

Comparative Method	Slope	Intercept g/dL [g/L]	Correlation Coefficient	n
TP Method on the aca® discrete clinical analyzer[i]	0.984	0.04 [0.4]	0.966	60[j]
Serum TP method on the Dimension® vs. plasma	0.982	0.37 [4.9]	0.9877	52[k]
Reduced vs. Standard sample size[l]	0.975	0.12 [1.2]	0.996	60[m]

i. Model equation for regression statistics is: Results of Dimension® TP system = [slope x (comparative method results)] + intercept.
j. Range of Samples: 2.8 – 8.8 g/dL [28 – 88 g/L].
k. Range of Samples: 3.0 – 11.6 g/dL [30 – 116 g/L].
l. Model equation for regression statistics is: Results of Dimension® TP system using reduced sample size (10 µL) = [slope x Results of Dimension® TP system using standard sample size (15 µL)] + intercept.
m. Range of samples: 3.9 – 9.7 g/dL [39 – 97 g/L].

Specificity

HIL Interference

The TP method (using the standard sample size of 15 µL) was evaluated for interference from hemolysis, icterus and lipemia according to CLSI/NCCLS EP7-P. Bias, defined as the difference between the control sample (does not contain interferent) and the test sample (contains the interferent), is shown in the table below. Bias exceeding 10% is considered "interference".

Substance Tested	Test Concentration SI Units	TP Concentration g/dL [g/L]	Bias* %
Hemoglobin (hemolysate)	300 mg/dL [0.19 mmol/L] (monomer)	3.9 [39]	<10
Bilirubin (unconjugated)	5 mg/dL [86 µmol/L]	3.8 [38]	<10
Lipemia (Intralipid®)	200 mg/dL [2.26 mmol/L]	3.9 [39]	<10
	600 mg/dL [6.78 mmol/L]	3.9 [39]	n

The TP method (using the reduced sample size of 10 µL) was evaluated for interference from hemolysis, icterus and lipemia according to CLSI/NCCLS EP7-P. Bias, defined as the difference between the control sample (does not contain interferent) and the test sample (contains the interferent), is shown in the table below. Bias exceeding 10% is considered "interference".

Substance Tested	Test Concentration SI units	TP Concentration g/dL [g/L]	Bias %
Hemoglobin (hemolysate)	200 mg/dL [0.12 mmol/L] (monomer)	3.2 [32]	<10
Bilirubin (unconjugated)	5 mg/dL [86 µmol/L]	3.2 [32]	<10
Lipemia (Intralipid®)	200 mg/dL [2.26 mmol/L]	3.1 [31]	<10
	600 mg/dL [6.78 mmol/L]	3.2 [32]	n

n. The interference testing at this level tripped a test report message; therefore the magnitude of the interference could not be determined.
* Analyte results should not be corrected based on this bias.

Non-Interfering Substances

The following substances have a negligible effect (< 0.2 g/dL [< 2 g/L]) on the TP method at the concentrations indicated:

Substance	Test Concentration	SI Units
Acetaminophen	0.025 mg/dL	1.66 µmol/L
Amikacin	15 mg/dL	256 µmol/L
Ampicillin	5.3 mg/dL	152 µmol/L
Ascorbic Acid	5 mg/dL	227 µmol/L
Caffeine	6 mg/dL	308 µmol/L
Carbamazepine	3 mg/dL	127 µmol/L
Chloramphenicol	5 mg/dL	155 µmol/L
Chlordiazepoxide	1 mg/dL	33.3 µmol/L
Chlorpromazine	0.2 ng/dL	6.27 µmol/L
Cholesterol	500 mg/dL	12.9 mmol/L
Cimetidine	2 mg/dL	79.2 µmol/L
Creatinine	30 mg/dL	2652 µmol/L
Diazepam	0.5 mg/dL	17.6 µmol/L
Erythromycin	6 mg/dL	81.6 µmol/L
Ethanol	400 mg.dL	86.8 mmol/L
Ethosuximide	25 mg/dL	1770 µmol/L
Furosemide	6 mg/dL	181 µmol/L
Gentamicin	12 mg/dL	251 µmol/L
Heparin	3 U/mL	3000 U/L
Ibuprofen	50 mg/dL	2425 µmol/L
Lidocaine	1.2 mg/dL	51.2 µmol/L
Lithium	2.3 mg/dL	3.2 mmol/L
Nicotine	0.1 mg/dL	6.2 µmol/L
Penicillin G	25 U/mL	25000 U/L
Pentobarbital	8 mg/dL	354 µmol/L
Phenobarbital	10 mg/dL	421 µmol/L
Phenytoin	5 mg/dL	198 µmol/L
Primidone	4 mg/dL	183 µmol/L
Propoxyphene	0.2 mg/dL	4.91 µmol/L
Salicylic Acid	60 mg/dL	4.34 mmol/L
Theophylline	4 mg/dL	222 µmol/L
Urea	500 mg/dL	83.3 mmol/L
Uric Acid	20 mg/dL	1190 µmol/L
Valproic Acid	50 mg/dL	3467 µmol/L

Analytical Sensitivity: ≤ 2.0 mg/dL [20 g/L]

The analytical sensitivity represents the lowest concentration of TP that can be distinguished from zero. This sensitivity is defined as the low assay range of TP.

Symbols Key: See adjacent panel.

Dimension®, aca® and Flex® are trademarks of Siemens Healthcare Diagnostics Inc.

©2008 Siemens Healthcare Diagnostics Inc.
All rights reserved.

Siemens Healthcare Diagnostics Inc.
Newark, DE 19714, U.S.A.
www.siemens.com/diagnostics

EC REP **Siemens Healthcare Diagnostics Ltd.**
Sir William Siemens Sq.
Frimley, Camberley, UK GU16 8QD

2008-04-23 J 717073.001 - US

แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

FM-LAB-008/00(01/10/2560)

ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-014 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ Total protein

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
11 พ.ย.62	0	ฉบับแรก	นายสิปปนนท์ฯ