นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ reticulocyte count โดยวิธีย้อมสี supravital stain ด้วยสี New Methylene Blue

นวลตา นัคราบัณฑิตย์[1]
กันตา เดิมสังข์[1]
ลัดดาวัลย์ มนัสธีรภาพ[1]
ชวดี นพรัตน์[2]

The optimum time for reticulocyte count using supravital staining with New Methylene Blue

Nakkarabandit N, Durmsung K, Manattiraphap L, Nopparatana C.
Hematology Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Tlailand

Songkla Med J 2008;26(3):283-291

Abstract:

Reticulocytes are young non-nucleated red cells which retain RNA within the cell. The reticulocyte count is useful to indicate marrow erythropoietic activity and also to classify the causes of anemia disease. The conventional method for enumerating percentage of reticulocytes is by staining with supravital stain by 0.5% New Methylene Blue and incubating at room temperature (25°C) within 1 hour. With an attempt to reduce the testing time, we studied the percentage of reticulocyte by increasing the temperature (37°C) by reducing the incubation time (5, 10 and 15 minutes) compared with the conventional method. The results showed no significant difference of the three methods compared with conventional method with p=0.67, 0.06, 0.15 respectively. There was close correlation between 3 conditions and conventional method with r=0.994, 0.996, 0.996

[1]ป.พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ [2]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก) นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
รับต้นฉบับวันที่ 5 มิถุนายน 2550 รับลงตีพิมพ์วันที่ 10 มีนาคม 2550

(p-value = <0.001, <0.001, <0.001) respectively. In addition, the incubation temperature at 37°C for 15 minutes showed the best staining quality. We conclude that the method with incubation temperature at 37°C for 15 minutes was the most suitable method. It could reduce testing time and also increase the quality of staining. This finding is useful for the hematologic laboratory to shorten turn-around time of reticulocyte count test and can result in service improvement.

Key words: *reticulocyte count, optimum condition, supravital stain, New Methylene Blue*

บทคัดย่อ:

เรทติคิวโลไซต์ (reticulocyte) คือ เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไม่มีนิวเคลียสแต่ยังมี RNA เหลืออยู่ในไซโตพลาสซึม การตรวจนับปริมาณ reticulocyte มีประโยชน์ใช้ประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไขกระดูกในการสร้างเม็ดเลือดแดง และใช้ประกอบการวินิจฉัยภาวะโลหิตจางเป็นต้น วิธีเดิมที่ใช้ในการตรวจนับค่าร้อยละของ reticulocyte คือ การย้อมด้วยสี supravital คือ 0.5% New Methylene Blue และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) 30 นาที ซึ่งเมื่อรวมเวลาอ่านผลจะใช้เวลาในการทดสอบนานถึงรายละ 1 ชั่วโมง เพื่อลดเวลาการทดสอบ ผู้ทำการศึกษาจึงได้ศึกษาค่าร้อยละของ reticulocyte โดยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 37°C และศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่สุดโดยปรับเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีเดิม ผลการศึกษาพบว่า วิธีที่ปรับอุณหภูมิเป็น 37°C และลดเวลา incubate ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกับวิธีเดิม ได้ค่า p=0.67, 0.06, 0.15 ตามลำดับ และค่าที่ทดสอบได้มีความสัมพันธ์กันดีมาก ได้ค่า r=0.994, 0.996, 0.996 (p-value = <0.001, <0.001, <0.001) ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้ทำการศึกษาพบว่า วิธีทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 15 นาที ให้คุณภาพการติดสีดีที่สุด ผู้ทำการศึกษาสรุปว่าวิธีทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 15 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด วิธีนี้สามารถลดเวลาการทดสอบ และให้คุณภาพการติดสีที่ดีกว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพงานบริการทางห้องปฏิบัติการด้านโลหิตวิทยา

คำสำคัญ: *การนับจำนวนเรทติคิวโลไซต์, สภาวะที่เหมาะสม, สีซูพราไวทัล, เม็ธธิลลีนบลู*

บทนำ

เรทติคิวโลไซต์ (reticulocyte) คือ เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไม่มีนิวเคลียส แต่ยังมีเศษ RNA เหลืออยู่ในไซโตพลาสซึม การตรวจนับจำนวน reticulocyte มีความสำคัญทางการแพทย์ คือ ใช้ประเมินประสิทธิภาพการทำงานของไขกระดูกในการสร้างเม็ดเลือดแดง และใช้ประกอบการวินิจฉัยจำแนกชนิดและติดตามการรักษาภาวะโลหิตจาง เป็นต้น[1-8] ในภาวะปกติผู้ใหญ่ชายมีค่า reticulocyte อยู่ระหว่างร้อยละ 0.5-2.0, ผู้หญิงมีค่า reticulocyte อยู่ระหว่างร้อยละ 0.5-2.5 และในเด็กแรกคลอดมีค่า reticulocyte อยู่ระหว่างร้อยละ 2.0-6.0[6] จำนวน reticulocyte ในกระแสเลือดจะสูงขึ้นในภาวะที่มีการทำลายเม็ดเลือดแดงทั้งจากสาเหตุทางพันธุกรรมหรือจากสาเหตุอื่นๆ เช่น paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)[9] ส่วนในภาวะที่ไขกระดูกไม่มีประสิทธิภาพในการสร้างเม็ดเลือดหรือมีการทำลายของเม็ดเลือดแดงระยะตัวอ่อนในไขกระดูก จะพบ reticulocyte ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ[9] และจะไม่พบเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในกระแสเลือดในภาวะซีดอันเกิดจากไขกระดูกฝ่อหรือมีความผิดปกติในการสร้างเม็ดเลือดของ stem cell[8]

วิธีการประเมิน reticulocyte ในกระแสเลือดสามารถทำได้หลายวิธี[5-6, 8] วิธีดั้งเดิมที่ใช้อยู่ทั่วไป คือ การนับจำนวน reticulocyte ด้วยวิธี manual วิธีนี้เป็นการย้อม RNA ในเซลล์ reticulcoyte ด้วยสี supravital ได้แก่ New Methylene Blue หรือ Brilliant Cresyl Blue นำส่วนผสมทำสเมียร์แห้ง (dry smear) ซึ่ง RNA ใน reticulocyte จะตกตะกอนมีลักษณะเป็นแกรนนูล หรือร่างแหสีน้ำเงินกระจายอยู่ภายในเซลล์ แล้วตรวจนับจำนวนเซลล์ reticulocyte ที่มีแกรนนูลสีน้ำเงินตั้งแต่ 2 จุดขึ้นไป นับรวมกับจำนวนเม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณค่า reticulocyte ออกมาเป็นร้อยละ ปัจจุบันมีการใช้เครื่องอัตโนมัติแบบ Flow cytometry ร่วมกับการย้อมโดยใช้สี Fluorescent แต่ราคาของเครื่องอัตโนมัติยังสูงมาก

การประเมิน reticulocyte count ด้วยวิธี manual โดยการย้อมสี supravital ใช้ 0.5% New Methylene Blue[10] เป็นวิธีที่

ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ เลือกใช้วิธีดังกล่าวใช้เวลาในขั้นตอนการย้อมสีนานถึง 30 นาที โดยวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) จึงจะนำส่วนผสมมาทำสเมียร์ แล้วใช้เวลาทำการนับค่าร้อยละ reticulocyte อีก 30 นาที รวมใช้เวลาในการทดสอบ reticulocyte count นานถึงรายละ 1 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ผู้ป่วยต้องรอนานถึง 1 ชั่วโมง กว่าจะได้การวินิจฉัย จากการสืบค้นข้อมูลพบรายงานเกี่ยวกับการย้อมสีที่อุณหภูมิ 37°C[11] ในเวลา 15-20 นาที แต่ยังไม่มีการประเมินผลการย้อมทั้งในส่วนของคุณภาพสเมียร์ reticulocyte และค่าร้อยละของ reticulocyte เทียบกับวิธีเดิม

คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาหาเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดสอบ reticulocyte count ด้วยวิธีย้อมสี supravital โดยใช้ 0.5% New Methylene Blue เพื่อหาวิธีการย้อมที่ใช้เวลาน้อยที่สุดที่ให้คุณภาพการติดสีที่ดี ซึ่งจะทำให้เวลาการคอยผลของผู้ป่วยลดลง เป็นประโยชน์ต่อการบริการ

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างในการศึกษา

ใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีสาร EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัวที่เหลือจากการทดสอบ reticulocyte count ประจำวัน จำนวน 200 ราย มีช่วงค่าร้อยละของ reticulocyte เท่ากับ 0.8-23.2

2. การทดสอบ

แบ่งตัวอย่างเลือดแต่ละรายมาทำการย้อมสี 4 วิธี โดยปรับปรุงอุณหภูมิและระยะเวลา incubate แตกต่างกันเป็น 4 แบบ โดยใช้เลือด 50 µl ผสมกับ 0.5% New Methylene Blue 50 µl ในหลอดทดลองแก้วขนาด 12x75 มม. ผสมให้เข้ากัน แล้ววางส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ วิธีที่ 1 วางที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เวลา 30 นาที ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่เดิม เปรียบเทียบกับวิธีการ incubat ที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำส่วนผสมมาทำสเมียร์แห้งวิธีละ 1 แผ่น

3. การประเมินผลการย้อม

3.1 นับปริมาณ reticulocyte โดยนำสเมียร์แห้งจากการย้อมด้วยสี 0.5% New Methylene Blue ทั้ง 4 วิธี คือ ที่อุณหภูมิห้อง 25°C เวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ในรายเดียวกัน นับค่า reticulocyte count ด้วยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์ แต่ละแผ่นนับเซลล์ reticulocyte บริเวณที่มีการกระจายของเซลล์ reticulocyte ต่อเม็ดเลือดแดงสม่ำเสมอ และนับเซลล์ reticulocyte ที่มีแกรนนูล หรือร่างแหสีน้ำเงินตั้งแต่ 2 จุดขึ้นไป ในเม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ ตามที่คณะกรรมการ National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)[12] กำหนด แล้วคำนวณค่า reticulocyte เป็นร้อยละ เพื่อเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสม

3.2 ศึกษาคุณภาพสเมียร์ reticulocyte ดูการติดสี ความคมชัด และความคงสภาพของการติดสีของเซลล์ reticulocyte และเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบทั้ง 4 วิธีในรายเดียวกัน

4. วิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ คำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นค่าร้อยละของ reticulocyte ระหว่างวิธีเดิมที่อุณหภูมิห้อง 25°C เวลา 30 นาที กับ 3 วิธีที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 5, 10 และ 15 นาที โดยวิธี paired t-test และทดสอบความสัมพันธ์ทางสถิติโดยวิธี Pearson's correlation

ผลการศึกษา

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าร้อยละของ reticulocyte ระหว่างวิธีเดิมกับวิธีใหม่ ที่อุณหภูมิ 37°C ในเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเป็นค่าร้อยละของ reticulocyte ที่ใกล้เคียงกัน และให้ผลการทดสอบทางสถิติ paired t-test ที่ไม่มีความแตกต่างกัน คือ ได้ค่า p=0.67, 0.06, 0.15 (α= 0.05) ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1 และค่าที่ทดสอบได้มีความสัมพันธ์กันดี (correlation) ได้ค่า r=0.994, 0.996, 0.996 (p-value = <0.001, <0.001, <0.001) ดังรูป ที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

ผลการประเมินคุณภาพสเมียร์ทั้ง 4 วิธี พบว่า วิธีที่ 4 (อุณหภูมิ 37°C เวลา 15 นาที รูปที่ 5D) คุณภาพการติดสี ความคมชัดดีที่สุด ซึ่งวิธีนี้ยังช่วยแยกเซลล์ reticulocyte ออกจากพวกตะกอนสีและออกจาก inclusion bodies ในกลุ่มโรคธาลัสซีเมียชนิด HbH (รูปที่ 6) ได้ด้วย ทำให้การนับค่าร้อยละ reticulocyte ได้ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น ส่วนวิธีที่ 3 (อุณหภูมิ 37°C เวลา 10 นาที รูปที่ 5C) คุณภาพการติดสี ความคมชัด รองจากวิธีที่ 4 ส่วนวิธีที่ 1 (อุณหภูมิ 25°C เวลา 30 นาที รูปที่ 5A) กับวิธีที่ 2 (อุณหภูมิ 37°C เวลา 5 นาที รูปที่ 5B) ให้คุณภาพการติดสี และความคมชัดของสเมียร์ที่ใกล้เคียงกัน แต่คุณภาพการติดสี ความคมชัดรองจากวิธีที่ 3 และวิธีที่ 4

ผลการประเมินความคงสภาพของการติดสีในระยะเวลาที่แตกต่างกันจากตัวอย่างตรวจจำนวน 200 ราย พบว่าการย้อมสีด้วยวิธีเดิมที่อุณหภูมิห้อง 25°C เวลา 30 นาที ให้ความคงสภาพของการติดสี ความคมชัด ร้อยละ 100 ที่ระยะเวลา 30 นาที และ

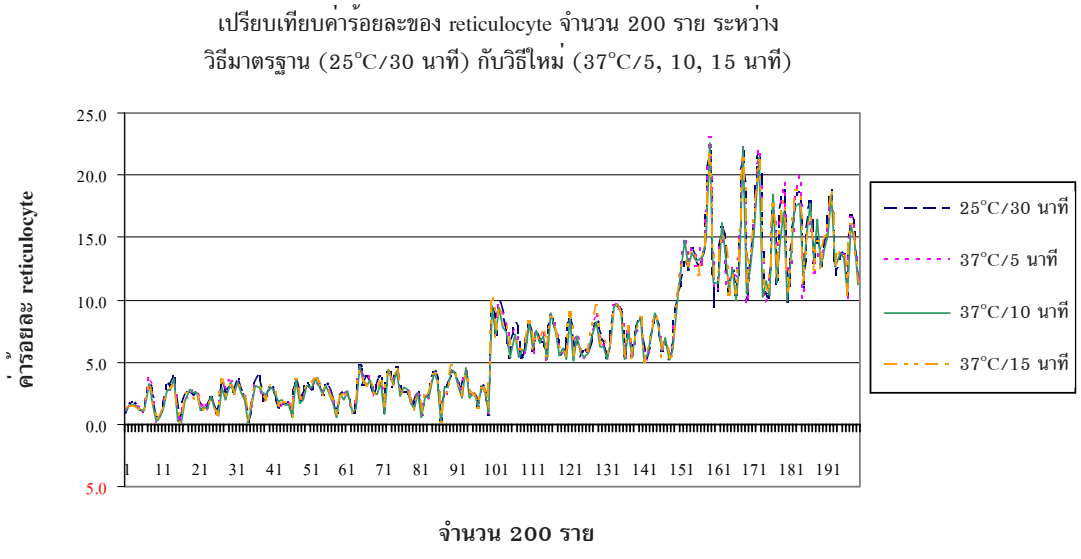
พบคุณภาพสเมียร์ที่ติดสีจาง ไม่คมชัด ที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 33 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.5 และที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 36 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ พบการย้อมสีที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 5 นาที ให้ความคงสภาพของการติดสี ความคมชัด ร้อยละ 100 ที่ระยะเวลา 30 นาที และพบคุณภาพสเมียร์ที่ติดสีจาง ไม่คมชัด ที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 5 และที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 24 ราย คิดเป็นร้อยละ 12, พบการย้อมสีที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 10 นาที ให้ความคงสภาพของการติดสี ความคมชัด ร้อยละ 100 ที่ระยะเวลาถึง 1 ชั่วโมง และพบคุณภาพสเมียร์ที่ติดสีจาง ไม่คมชัด ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 6 และพบว่าการย้อมสีที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 15 นาที ให้ความคงสภาพของการติดสี ความคมชัด ร้อยละ 100 ที่ระยะเวลาถึง 2 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบผลการทดสอบ reticulocyte count จำนวน 200 ราย ในสภาวะที่ต่างกัน

วิธีทดสอบ	ค่าร้อยละ reticulocyte		paired t-test (α=0.5) ระหว่างวิธีเดิมกับวิธีใหม่
	ค่าเฉลี่ย	SD	
1. วิธีเดิม (25°C/30 นาที)	5.90	7.21	_
2. วิธีใหม่ (37°C/5 นาที)	6.10	7.00	P=0.67
3. วิธีใหม่ (37°C/10 นาที)	6.20	7.14	P=0.06
4. วิธีใหม่ (37°C/15 นาที)	6.30	7.14	P=0.15

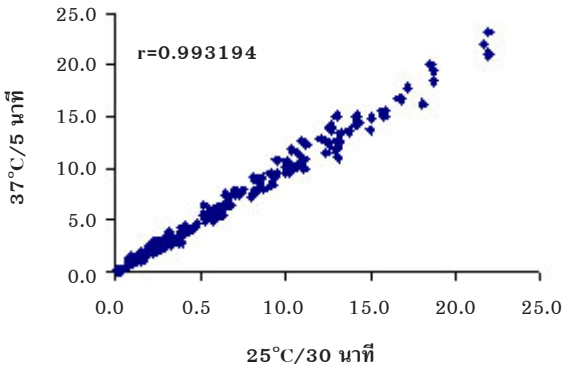
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนรายของสเมียร์ที่มีคุณภาพที่ระยะเวลาต่าง ๆ จากตัวอย่างตรวจ จำนวน 200 ราย

วิธี	จำนวนรายของสเมียร์ที่มีคุณภาพ		
	ที่ระยะเวลา 30 นาที (ร้อยละ)	ที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง (ร้อยละ)	ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง (ร้อยละ)
1. วิธีเดิม (25°C/30 นาที)	200 (100)	167 (83.5)	164 (82.0)
2. วิธีใหม่ (37°C/5 นาที)	200 (100)	190 (95.0)	176 (88.0)
3. วิธีใหม่ (37°C/10 นาที)	200 (100)	200 (100)	188 (94)
4. วิธีใหม่ (37°C/15 นาที)	200 (100)	200 (100)	200 (100)



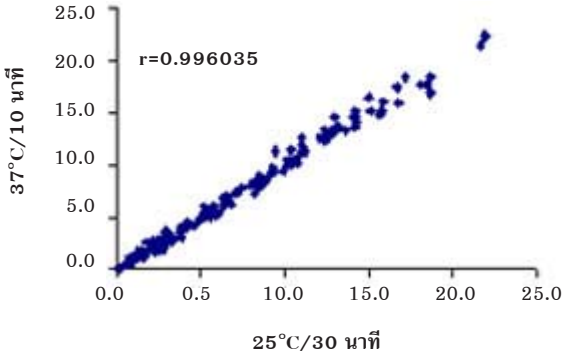
รูปที่ 1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าร้อยละของ reticulocyte count จำนวน 200 ราย ในสภาวะที่ต่างกัน

เปรียบเทียบความสัมพันธ์เป็นค่าร้อยละของ reticulocyte จำนวน 200 ราย ระหว่างวิธีเดิม (25°C/30 นาที) กับวิธีใหม่ (37°C/5 นาที)



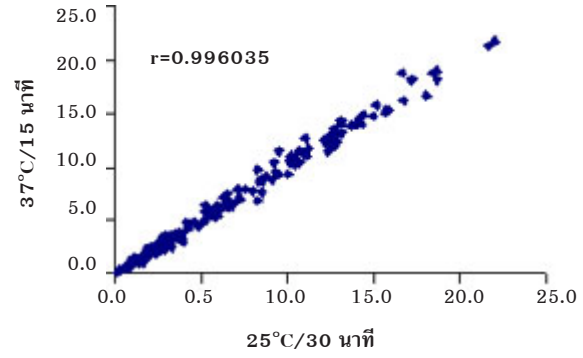
รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของ reticulocyte count ระหว่างวิธีเดิม (25°C/30 นาที) กับวิธีใหม่ (37°C/5 นาที)

เปรียบเทียบความสัมพันธ์เป็นค่าร้อยละของ reticulocyte จำนวน 200 ราย ระหว่างวิธีเดิม (25°C/30 นาที) กับวิธีใหม่ (37°C/10 นาที)

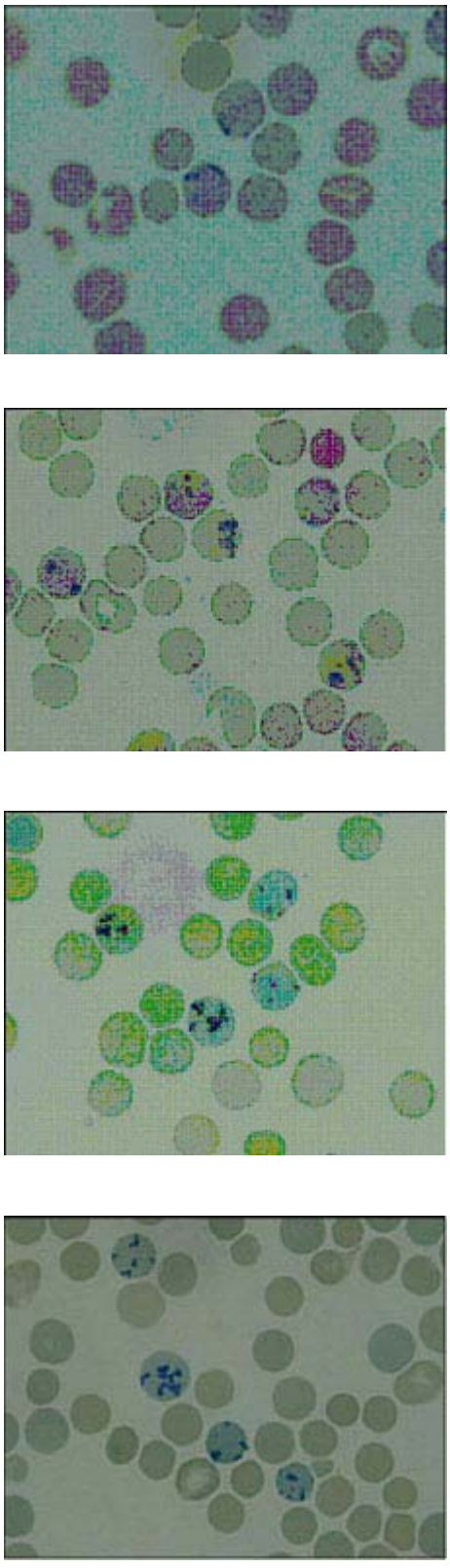


รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของ reticulocyte count ระหว่างวิธีเดิม (25°C/30 นาที) กับวิธีใหม่ (37°C/10 นาที)

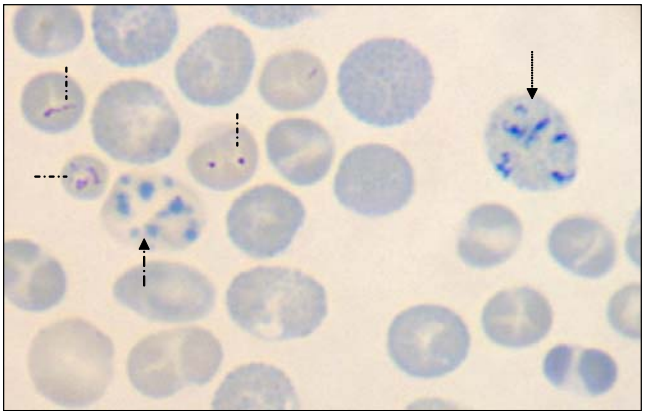
เปรียบเทียบความสัมพันธ์เป็นค่าร้อยละของ reticulocyte จำนวน 200 ราย ระหว่างวิธีเดิม (25°C/30 นาที) กับวิธีใหม่ (37°C/15 นาที)



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของ reticulocyte count ระหว่างวิธีเดิม (25°C/30 นาที) กับวิธีใหม่ (37°C/15 นาที)



รูปที่ 5 แสดงคุณภาพของสเมียร์ reticulocyte ระหว่าง วิธีเดิม 25°C/30 นาที (A) กับวิธีใหม่ 37°C/5 นาที (B), 10 นาที (C) และ 15 นาที (D) ตามลำดับ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)



หมายถึง ตะกอนสี
หมายถึง Inclusion body
หมายถึง เซลล์ reticulocyte

รูปที่ 6 วิธีใหม่ (37°C/15นาที) แยกเซลล์ reticulocyte ออกจาก inclusion body และตะกอนสี (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

วิจารณ์

การศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิและเวลาหรือสภาวะที่มีผลต่อการทำ reticulocyte count ในการย้อมเซลล์ reticulocyte ด้วยสี supravital stain ใช้ 0.5% New Methylene Blue ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ทั้ง 3 วิธีที่อุณหภูมิ 37°C ในเวลา 5, 10 และ 15 นาที กับวิธีเดิมที่อุณหภูมิห้อง 25°C เวลา 30 นาที ให้ค่า reticulocyte count ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และมีความสัมพันธ์กันในระดับดีมาก ($r=0.994, 0.996, 0.996$ และค่า p-value = $<0.001, <0.001, <0.001$) ผลการศึกษานี้ตรงกับข้อเสนอแนะของโสภาค โรจนเสถียร และคณะ[8] และ พรเทพ เทียนสิวากุล[13] ซึ่งชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาการย้อมสี กล่าวคือ อุณหภูมิที่สูงขึ้นช่วยเร่งปฏิกิริยาการย้อมสีให้ติดดีและเร็วขึ้น ใช้เวลาในการย้อมลดลง ในทางกลับกัน หากอุณหภูมิต่ำ ปฏิกิริยาการย้อมสีจะเกิดขึ้นช้า ต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาการย้อมสีที่นานขึ้นจึงจะติดสีได้ดี

นอกจากประเด็นเรื่องอุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยาของการย้อมสีแล้ว ผลการศึกษาความคงสภาพของการติดสีของเซลล์ reticulocyte และเม็ดเลือดแดง พบว่า วิธีที่เลือกใช้มีความคงสภาพของการติดสีของเซลล์ถึง 2 ชั่วโมง ในขณะที่วิธีอื่นคุณภาพของการติดสีจะลดลงในเวลาที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับข้อเสนอแนะของ Onofrio และคณะ[14] ที่กล่าวว่า เมื่อตั้งสเมียร์ที่แห้งแล้วไว้นาน คุณภาพของการติดสี ความคมชัดของเซลล์ reticulocyte และเม็ดเลือดแดงจะลดลง

ผลจากการศึกษาครั้งนี้มีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง เช่น หากเป็นห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์ไม่พร้อม เช่น ไม่มีเครื่อง incubator หรือ water bath ปรับอุณหภูมิ ก็ควรเลือกใช้วิธีการเดิม และควรอ่านสเมียร์ที่ย้อมสีแล้วภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที หากเกิน 30 นาที คุณภาพของการติดสี ความคมชัดของ reticulocyte และเม็ดเลือดแดงจะลดลง แต่หากเป็นห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์พร้อม และมีปริมาณตัวอย่างจำนวนมาก หรือแพทย์ต้องการผลด่วน ควรเลือกใช้วิธีการย้อมสีที่อุณหภูมิ 37°C และเลือกเวลาการย้อมสีตามความเหมาะสม เช่น หากเลือกย้อมสีในเวลา 5 นาที ควรทำการนับค่าร้อยละภายใน 30 นาที หลังจากสเมียร์แห้ง เช่นเดียวกับวิธีเดิม เนื่องจากให้คุณภาพสเมียร์ที่ใกล้เคียงกัน และหากไม่สามารถทำการนับ reticulocyte ได้ทันที ควรเลือกใช้เวลาการย้อมที่ 10 หรือ 15 นาที เพราะทั้งสองวิธีนี้ให้คุณภาพการติดสี ความคมชัดได้นานมากกว่า 1 ชั่วโมง โดยเฉพาะวิธีที่ 4 ยังช่วยแยกเซลล์ reticulocyte ออกจาก inclusionbody ในกลุ่มโรคธาลัสซีเมีย Hb H ได้ และแยกจากพวกตะกอนสีได้ชัดเจนอีกด้วย

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, CV) ของวิธีย้อมเซลล์ reticulocyte ด้วยสี 0.5% New Methylene Blue ที่อุณหภูมิ 37°C ในเวลา 15 นาที จากตัวอย่างตรวจจำนวน 10 ราย นับโดยผู้นับ 3 คน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของ reticulocyte ± SD = 1.05±0.10, 1.36 ±0.05, 3.30±0.08, 4.62±0.12, 6.67±.20, 10.67±0.21, 12.28±0.31, 14.71±0.15, 20.37±0.35, 36.31±0.40 และค่า % CV=9.52, 3.68, 2.42, 2.60, 3.00, 1.97, 2.52, 1.02, 1.72 และ 1.10 ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อค่า reticulocyte สูงขึ้น ความแม่นยำในการนับจะมากขึ้น สอดคล้องกับ Ferguson และคณะ[15] ที่ศึกษาค่า reticulocyte count ที่ช่วงค่าต่างๆ โดยวิธี manual ได้ค่าดังนี้ คือ reticulocyte 0.2-0.7% ค่า CV=28.00%; 4.0-5.5 % ค่า CV=8.84% และ 6.1-9.9 % ค่า CV=15.35% ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าการนับเซลล์ reticulocyte โดยวิธี manual ย้อมด้วยสี 0.5% New Methylene Blue ที่อุณหภูมิ 37°C ในเวลา 15 นาที มีความแม่นยำสูง แต่ทั้งนี้ต้องปฏิบัติตามข้อจำกัด อันเนื่องจากข้อผิดพลาดจากการเตรียมตัวอย่างตรวจ วิธีการย้อมสี การทำสเมียร์เลือดและการกระจายตัวของเม็ดเลือดแดง ปริมาณและวิธีการที่ใช้นับ ตลอดถึงความแตกต่างของทักษะในแต่ละคน

และการนับเซลล์ reticulocyte โดยวิธี manual ย้อมด้วยสี 0.5% New Methylene Blue เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและประหยัด แต่ผู้ที่ทำหน้าที่ตรวจทางห้องปฏิบัติการต้องมีความรู้ ความระมัดระวังในการทำการทดสอบ ก็จะเพิ่มความถูกต้องในการนับจำนวน reticulocyte มากยิ่งขึ้น หากขาดความรู้หรือความระมัดระวังในการทำการทดสอบจะทำให้การทดสอบขาดความแม่นยำและเที่ยงตรง

สรุป

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ reticulocyte count โดยวิธีย้อมสี supravital stain ด้วยสี 0.5% New Methylene Blue ซึ่งได้ทำการทดลองโดยการปรับอุณหภูมิและเวลาในการย้อมสี พบอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่สุด คือ อุณหภูมิ 37°C เวลา 15 นาที ซึ่งนอกจากจะลดเวลาจากวิธีเดิมลง คือ 15 นาที แล้ว ยังมีข้อดีในเรื่องความคงทนและความคมชัดของการติดสี ทำให้นับ reticulocyte ได้ดีขึ้น การทดสอบเปรียบเทียบเวลาในการย้อมสีต่าง ๆ กัน ทำให้สามารถนำผลการศึกษาไปปรับใช้กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการ และปริมาณของตัวอย่างตรวจได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Mehta AB, Hoffbrand AV. Haematology at a glance. London: Blackwell Science; 2000;12.
2. Kjeldsberg CR, editor. Practical diagnosis of hematologic disorders. 2nd ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologist; 1995;3-19.
3. Mengel CE, Frel E, Nachman R. Hematology principles and practice. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1972;6.
4. Besa EC, Catalano PM, Kant JA, Jefferies LC. The National Medical Series for Independent Study hematology. Baltimore: William & Wilkins; 1992;5-6.
5. Onofrio GD, Zini G, Rovan RM. Reticulocyte counting: methods and clinical applications. In: Rowan RM, Van Assendelft OW, Preston FE, editors. Advanced laboratory methods in haematology. London: Arnold; 2002; 78-126.
6. ธรรมศักดิ์ ประสานพานิช. เวชศาสตร์ชันสูตร ภาคโลหิตวิทยา. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช; 2516;153-9.
7. อานนท์ บุณยะรัตเวช. โลหิตวิทยา: เม็ดเลือดแดง. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง; 2535;8-9.
8. โสภาค โรจนเสถียร, ศักดิ์ณรงค์ รัมมะวาส, อาจิตร ตีรกาญจนา, บริหาร สุวรรณเรือง, บรรณาธิการ. ปฏิบัติการโลหิตวิทยา. กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์; 2540;27-99
9. เสถียร สุขพณิชนันท์. ความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. ใน: นิศารัตน์ โอภาสเกียรติกุล, วัฒนา เลี้ยววัฒนา, ดาราวรรณ วนะชิวนาวิน, มงคล คุณากร, วนิดา วงศ์ถิราพร, บรรณธิการ. พยาธิวิทยาคลินิก. กรุงเทพฯ: สมาคมพยาธิวิทยาคลินิกไทย (สพคท.); 2545;259-71.
10. Bauer JD, Ackermann PG, Toro G. Clinical laboratory methods. 8th ed. Saint Louis: CV Mosby; 1974.
11. Finch CA, Marshall PN, Breches G, Trobaugh FE, Van Assendelft OW. Propose standard method for reticulocyte counting H-16P. NCCLS 1985;5:225-36.
12. Finch CA, Marshall PN, Trobangh FE. Method for reticulocyte counting. NCCLS approved Standard H16-P. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1985.
13. พรเทพ เทียนสิวากุล, บรรณาธิการ. โลหิตวิทยาคลินิก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2541; 90-140.
14. Onofrio GD, Zini G, Rovan RM. Reticulocyte counting: methods and clinical applications. In: Rowan RM, Van Assendelft OW, Preston FE, editors. Advanced laboratory methods in haematology. London: Arnold; 2002; 81.
15. Ferguson DJ. Siow-Fong Lee, Gordon PA. Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in a routine laboratory. Am J Hematol 1990;33:13-7.