Original Article

ความชุกและวิธีแก้ปัญหาของภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอม เนื่องจากสาร EDTA ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ชวดี นพรัตน์*
ดาริน ชวะกูล
นวลตา นัคราบัณฑิตย์

Prevalence and Problem-Solving Method of EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia at Songklanagarind Hospital.

Chawadee Nopparatana, Darin Chawakul, Nauanta Nakkarabundit.
Hematology Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand.
***E-mail: Chawadee.n@psu.ac.th**
Songkla Med J 2015;33(6):293-303

บทคัดย่อ:
วัตถุประสงค์: รายงานความชุกของภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอม เนื่องจากเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มเมื่อเจาะเก็บเลือดโดยใช้สาร ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) [EDTA-dependent pseudothrombocytopenia (EDTA-PTCP)] ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และแก้ปัญหาเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มในตัวอย่างที่ตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP
วัสดุและวิธีการ: เก็บตัวอย่างเลือดที่ใส่สาร EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ที่หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 จำนวน 202 ราย ประกอบด้วยกลุ่มที่ตรวจพบ EDTA-PTCP 158 ราย และกลุ่มปกติที่ตรวจไม่พบ EDTA-PTCP 44 ราย ใส่ kanamycin 5 มิลลิกรัม ในตัวอย่างเลือด 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสมสารความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำไปตรวจนับเกล็ดเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ
ผลการศึกษา: ความชุกของภาวะ EDTA-PTCP ที่ตรวจพบที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ คิดเป็นร้อยละ 0.04 (158 จากทั้งหมด 384,324 ราย) เมื่อเติม kanamycin ลงในตัวอย่างเลือดที่พบภาวะ EDTA-PTCP พบว่าเกล็ดเลือดกระจายตัวได้ดีขึ้น 130 ราย ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดในกลุ่ม EDTA-PTCP หลังเติม kanamycin ($234.5\pm104.0\times10^3/\mu L$) สูงกว่าก่อนเติม ($119.5\pm87.1\times10^3/\mu L$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value}<0.001$) ในขณะที่กลุ่มปกติ ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดก่อนและหลังเติม kanamycin เมื่อตรวจดูรูปร่างลักษณะ

หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รับต้นฉบับวันที่ 9 กรกฎาคม 2558 รับลงตีพิมพ์วันที่ 28 กันยายน 2558

เซลล์เม็ดเลือดจากสเมียร์เลือดย้อมสีไรท์ พบว่า kanamycin ทำให้เม็ดเลือดแดงหดตัวและติดสีแดงมากขึ้น เกล็ดเลือดติดสีจางลง ในขณะที่เม็ดเลือดขาวยังคงมีรูปร่างและการติดสีปกติ
สรุป: วิธีเติม kanamycin ลงในตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP สามารถทำให้เกล็ดเลือดที่เกาะกลุ่มมีการกระจายตัวได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการตรวจนับค่าเกล็ดเลือดให้แม่นยำขึ้น

คำสำคัญ: EDTA-PTCP, การนับเกล็ดเลือด

Abstract:

Objective: To determine the prevalence of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) dependent pseudo-thrombocytopenia (EDTA-PTCP) at Songklanagarind Hospital and to solve the problem of platelet clumping in EDTA-PTCP blood specimens.
Material and Method: Blood specimens were collected with EDTA as an anticoagulant at Hematology Unit, Department of Pathology, Songklanagarind Hospital from 2011 to 2012. A total of 202 specimens including 158 EDTA-PTCP and 44 normal individuals with non EDTA-PTCP were studied. Five milligram kanamycin was added to 0.5 ml of the blood specimens and mixed for 5 minutes with a vortex mixer at the speed of 2000 rpm. The specimens were then analysed for platelet count by automated blood cell analyzer.
Results: Prevalence of EDTA-PTCP at Songklanagarind Hospital was 0.04% (158 in 384,324 blood specimens). When kanamycin was added to 158 EDTA-PTCP specimens, the dissociation of clumping platelet was detected in 130 specimens. The mean platelet count and standard deviation in the EDTA-PTCP group after adding kanamycin ($234.5\pm104.0 \times 10^3/\mu L$) was significantly higher than those of without kanamycin ($119.5\pm87.1 \times 10^3/\mu L$) (p-value<0.001). There was no significant change in the platelet count of specimens from normal group. However, kanamycin caused crenated and acidically stained red blood cells, palely stained platelet whereas no morphological change was observed in white blood cells.
Conclusion: The method of adding kanamycin to EDTA-PTCP blood specimens is able to dissociate the platelet clumping which is useful for evaluation of precise platelet count.

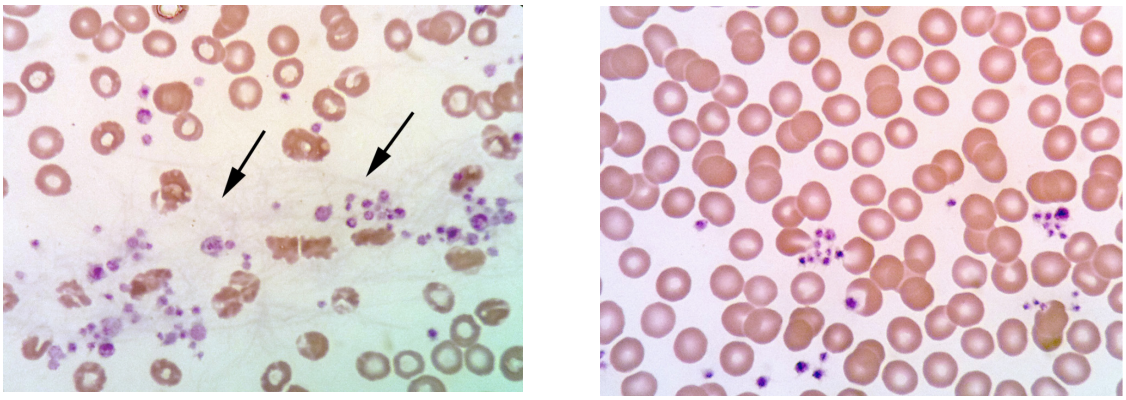
Keywords: EDTA-PTCP, platelet count

บทนำ

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) เป็นสารเคมีกลุ่ม polyprotic acid ซึ่งมีคุณสมบัติในการยึดจับ (chelate) กับแคลเซียมในอัตราส่วน 1:1 นิยมใช้เป็นสารกันเลือดแข็งตัวในรูปแบบของเกลือประเภทโซเดียม (Na_2EDTA) หรือโปแตสเซียม (K_2EDTA, K_3EDTA) สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อทดสอบทางโลหิตวิทยา เช่น การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC) ด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ เป็นต้น[1]

เมื่อเจาะเก็บตัวอย่างเลือดใส่ในหลอดที่มีสาร EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว ในผู้ป่วยบางรายอาจเกิดปรากฏการณ์ที่เกล็ดเลือดมีการเกาะกลุ่ม เป็นผลให้การนับจำนวนเกล็ดเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติต่ำกว่าความเป็นจริงที่เรียกว่า EDTA-dependent pseudothrombocytopenia (EDTA-PTCP) สาเหตุ

ของ EDTA-PTCP ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการที่ EDTA ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ receptor ชนิด GPIIb-IIIa บนผิวของเกล็ดเลือดแล้วไปกระตุ้นให้เกล็ดเลือดเผยโปรตีนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ ได้แก่ Granule Membrane Protein140 (GMP140) Gp55 (type III lysosomal glycoprotein และ thrombospondin) ซึ่งไปกระตุ้นปฏิกิริยา tyrosine kinase pathway ทำให้เกล็ดเลือดมีการเกาะกลุ่ม[2-8] ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นเฉพาะในหลอดทดลอง (in vitro) ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในร่างกายมนุษย์ แต่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการรายงานจำนวนเกล็ดเลือดซึ่งมีผลต่อการวินิจฉัยและวางแผนการรักษาผู้ป่วย การวินิจฉัยภาวะ EDTA-PTCP ทางห้องปฏิบัติการทำได้โดยตรวจสเมียร์เลือดย้อมสีไรท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบลักษณะเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มโดยไม่พบใยไฟบริน ซึ่งใยไฟบรินจะพบได้ในภาวะที่เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มเนื่องจากมีการแข็งตัวของเลือดบางส่วนจากขั้นตอนการเจาะเก็บเลือดไม่เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 1 นอกจากนี้ผู้ป่วยที่พบ EDTA-PTCP จะไม่แสดงอาการเลือดออกผิดปกติเนื่องจากเกล็ดเลือดต่ำ[5,8] รายงานการตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส[9] ผู้ป่วยที่เตรียมการผ่าตัด[10,11] เด็กแรกคลอดที่มีการส่งผ่านแอนติบอดีมาจากมารดา[12-14] และในหญิงมีครรภ์[15] รวมถึงรายงานอุบัติการณ์ที่ตรวจพบในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลต่างๆ อยู่ในช่วงร้อยละ 0.1 ถึง 2.0[16,17] การแก้ไขปรากฏการณ์ที่พบในสิ่งส่งตรวจนี้ทางห้องปฏิบัติการทำได้หลายวิธี เช่น การนำตัวอย่างเลือดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจนับ การเจาะเลือดใหม่ใส่สาร sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็ง การนับเกล็ดเลือดเจาะจากปลายนิ้วด้วยวิธีใช้ counting chamber และการเจาะเลือดใหม่โดยเติมสาร kanamycin หรือ amikacin ในหลอดบรรจุเลือดที่มีสาร EDTA เป็นต้น[4,17-23] ซึ่งข้อจำกัดของวิธีการเหล่านี้คือต้องเจาะเก็บเลือดจากผู้ป่วยซ้ำ ทำให้สูญเสียเวลาและค่าใช้จ่าย อย่างไรก็ตาม Sakurai และคณะ[18] ได้รายงานการเติมยา kanamycin 20 มิลลิกรัมลงในเลือด 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างเลือด 28 ราย ที่ตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP ช่วยให้เกล็ดเลือดมีการกระจายตัวได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น แต่มีข้อจำกัดคือต้องเป็นเลือดที่เจาะเก็บและส่งตรวจภายในเวลา 30 นาที



Blood clot EDTA-PTCP

รูปที่ 1 ลักษณะเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มเนื่องจากเลือดแข็งตัว (blood clot) มองเห็นใยไฟบริน (ลูกศรชี้) และเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มโดยไม่พบใยไฟบริน (EDTA-PTCP)

การศึกษาครั้งนี้เพื่อรายงานความชุกของภาวะ EDTA-PTCP ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 และแก้ปัญหาวิธีการตรวจนับเกล็ดเลือดในภาวะ EDTA-PTCP โดยการเติมสาร kanamycin ลงในเลือดเพื่อนำมาใช้ในการตรวจประจำวันที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างเลือดที่มีสาร EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เหลือจากการทดสอบที่หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 (การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ 56-307-0508) โดยเก็บตัวอย่างเลือด 202 ราย แบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจสเมียร์เลือดย้อมสีไรท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบลักษณะเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มโดยไม่พบใยไฟบริน (EDTA-PTCP) 158 ราย และกลุ่มตัวอย่างปกติที่ไม่พบเกล็ดเลือดเกาะกลุ่ม (normal) 44 ราย (คำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างสำหรับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลสองกลุ่มที่ไม่อิสระต่อกันโดยใช้สูตร $n=(Z_{1-\alpha/2}+Z_{1-\beta})^2 SD^2/(\mu d)^2$ แทนค่า α=0.05, β=0.20, S.D.=95, μd=50) โดยมีเกณฑ์คัดออกคือ ตัวอย่างเลือดที่ตรวจสเมียร์เลือดย้อมสีไรท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบลักษณะเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มพร้อมกับมีใยไฟบริน และตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบลักษณะเลือดแข็งตัวบางส่วนในหลอดบรรจุเลือด

วิธีการศึกษา

การบันทึกข้อมูล บันทึกข้อมูลอายุ (age) เพศ (gender) หอผู้ป่วยที่ส่งสิ่งส่งตรวจ (source of specimen) เวลาเริ่มต้นเจาะเก็บเลือด และเวลาที่ตรวจพบ EDTA-PTCP เพื่อนำเวลามาคำนวณเป็นระยะเวลาตั้งแต่การเจาะเก็บเลือดจนถึงเริ่มทำการทดสอบ (storage time)

วิธีนับเกล็ดเลือด แบ่งเลือดใส่หลอดทดลอง A และ B หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติม kanamycin 5 มิลลิกรัม ลงในหลอด B นำหลอดทั้งสองไปผสมด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex-genie2 model G550E, New York) ระดับความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจนับเกล็ดเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Sysmex XT1800i, Japan)[24] และเตรียมสเมียร์เลือดย้อมสีไรท์ รายละ 2 แผ่น นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ตรวจดูการกระจายของเกล็ดเลือดอย่างน้อย 20 oilfields โดยใช้ผู้ตรวจคนเดียวตลอดการศึกษาครั้งนี้

การวิเคราะห์ผล

1. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดที่นับด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติจากตัวอย่างเลือดก่อน (A) และหลัง (B) เติมสาร kanamycin โดยใช้สถิติ paired t-test วิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณค่า p-value ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2010

2. เปรียบเทียบค่าดัชนีความสัมพันธ์ (relative index)[18] ของจำนวนเกล็ดเลือดก่อน (A) และหลัง (B) เติมสาร kanamycin ที่คำนวณจากสูตร (B/A)*100 ระหว่างกลุ่ม EDTA-PTCP และกลุ่มปกติ

3. เปรียบเทียบการกระจายของเกล็ดเลือด การติดสีและรูปร่างลักษณะของเกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวจากสเมียร์เลือดย้อมสีไรท์ก่อนและหลังเติมสาร kanamycin

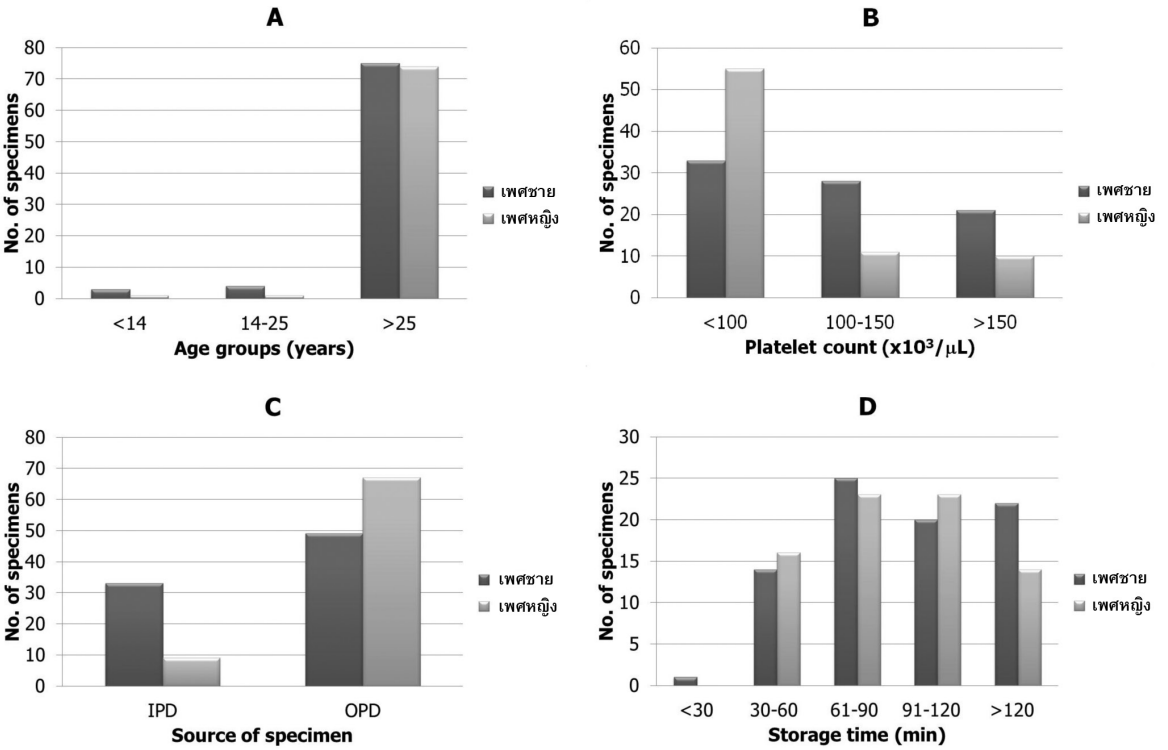
ผลการศึกษา

จากตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจที่หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 จำนวน 384,324 ราย พบตัวอย่างเลือดที่มีภาวะ EDTA-PTCP จำนวน 158 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.04 แยกเป็นตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยเพศชาย 82 ราย ผู้ป่วยเพศหญิง 76 ราย ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดนี้มี 149 ราย เป็นผู้ป่วยที่อายุมากกว่า 25 ปี 5 ราย เป็นผู้ป่วยช่วงอายุ 14-25 ปี และ 4 ราย เป็นผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 14 ปี เมื่อแยกกลุ่มตามช่วงค่าเกล็ดเลือดที่ตรวจนับได้พบว่า

88 ราย มีช่วงค่าเกล็ดเลือดต่ำกว่า 100x10^3/µL 39 ราย มีช่วงค่าเกล็ดเลือดระหว่าง 100-150x10^3/µL และ 31 ราย มีช่วงค่าเกล็ดเลือดมากกว่า 150 x10^3/µL ตัวอย่างเลือดเป็นเลือดที่เจาะจากหอผู้ป่วย 42 ราย และเลือดที่เจาะจากหน่วยชันสูตรผู้ป่วยนอก 116 ราย ระยะเวลาตั้งแต่การเจาะเลือดจนถึงขั้นตอนการตรวจนับเกล็ดเลือดแบ่งเป็นช่วงเวลา 31-60 นาที 61-90 นาที 91-120 นาที และมากกว่า 120 นาที ตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP 30, 48, 43 และ 36 ราย ตามลำดับ มีเพียง 1 ราย ที่ระยะเวลาตั้งแต่การเจาะเลือดจนถึงขั้นตอนการตรวจนับเกล็ดเลือดน้อยกว่า 30 นาที รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1 และกราฟแสดงจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบแยกตาม เพศ อายุ แหล่งที่มาของตัวอย่างเลือด และอายุของตัวอย่างตรวจ ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 1 ความชุกของภาวะ EDTA-PTCP ที่ตรวจพบที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554-2555 แยกกลุ่มตามอายุ (age group) จำนวนเกล็ดเลือด (platelet count) แหล่งที่มาของตัวอย่างเลือด (source of specimens) และระยะเวลาตั้งแต่การเจาะเก็บเลือดจนถึงเริ่มทำการทดสอบ (storage time)

	ชาย		หญิง		รวม	
	จำนวน (ราย)	Platelet count (x10^3/µL) Mean (min-max)	จำนวน (ราย)	Platelet count (x10^3/µL) Mean (min-max)	จำนวน (ราย)	Platelet count (x10^3/µL) Mean (min-max)
Prevalence	82	132.66 (27-523)	76	87.75 (4-439)	158	111.06 (4-523)
Age group (years)						
<14	3	294.33 (132-523)	1	150	4	258.25 (132-523)
14-25	4	195 (43-435)	1	53	5	166.6 (43-435)
>25	75	123.47 (27-446)	74	87.2 (4-439)	149	105.54 (4-446)
Platelet count (x10^3/µL)						
<100	33	64.48 (27-97)	55	58.83 (4-99)	88	61.93 (4-107)
100-150	28	122.92 (100-149)	11	121.67 (91-150)	39	123.08 (100-149)
>150	21	253.95 (154-523)	10	215 (152-439)	31	235.39 (128-523)
Source of specimens						
IPD	33	171.76 (27-523)	9	148.89 (53-439)	42	166.86 (27-523)
OPD	49	106.33 (37-435)	67	79.54 (4-221)	116	90.85 (4-435)
Storage time (min)						
1-30	1	84	0	-	1	84
31-60	14	89.29 (41-171)	16	101.25 (21-439)	30	95.67 (21-439)
61-90	25	108.16 (43-183)	23	89.52 (4-221)	48	99.23 (4-221)
91-120	20	140.95 (37-435)	23	71.70 (9-170)	43	104.75 (9-435)
>120	22	184.76 (27-523)	14	95.79 (33-217)	36	149.17 (27-523)



รูปที่ 2 กราฟแสดงจำนวนผู้ป่วยชายและหญิงที่ตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP โดยแยกกลุ่มดังนี้
A. แยกกลุ่มตามช่วงอายุ (age group)
B. แยกกลุ่มตามจำนวนเกล็ดเลือด (platelet count)
C. แยกกลุ่มตามแหล่งที่มาของตัวอย่างเลือด (source of specimen)
D. แยกกลุ่มตามระยะเวลาตั้งแต่การเจาะเก็บเลือดจนถึงเริ่มทำการทดสอบ (storage time)

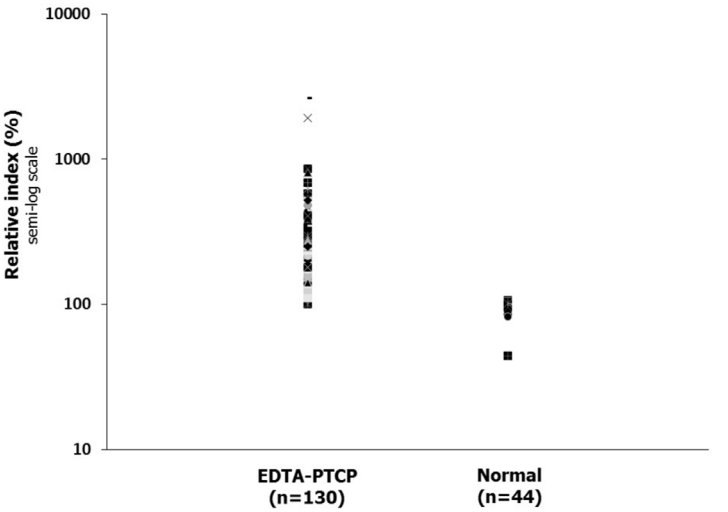
เมื่อเติมสาร kanamycin ลงไปในตัวอย่างเลือดที่พบภาวะ EDTA-PTCP ทั้ง 158 ราย พบว่าช่วยให้เกล็ดเลือดกระจายตัวได้ 130 ราย ค่าเฉลี่ยของจำนวนเกล็ดเลือดในกลุ่มตัวอย่างที่พบภาวะ EDTA-PTCP หลังเติม kanamycin (234.5±104.0) สูงกว่าก่อนเติม (119.5±87.1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value< 0.001) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างปกติทั้ง 44 ราย ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดก่อนและหลังเติม kanamycin ดังแสดงในตารางที่ 2

ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของดัชนีความสัมพันธ์ของจำนวนเกล็ดเลือดก่อนและหลังเติมสาร kanamycin ในกลุ่มตัวอย่างที่พบภาวะ EDTA-PTCP เท่ากับร้อยละ 100-2622.2 และในกลุ่มตัวอย่างปกติเท่ากับร้อยละ 44.4-106.1 การกระจายตัวของค่าดัชนีความสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างที่พบภาวะ EDTA-PTCP และกลุ่มตัวอย่างปกติ ดังแสดงในรูปที่ 3

การตรวจรูปร่างลักษณะเซลล์เม็ดเลือดจากสเมียร์เลือดย้อมสีไรท์ พบว่า kanamycin ช่วยให้เกล็ดเลือดกระจายตัวดีขึ้นแต่การติดสีจางลง เม็ดเลือดแดงหดตัวและติดสีแดงเข้มกว่าปกติ ในขณะที่เม็ดเลือดขาวยังคงมีรูปร่างและการติดสีปกติ ดังแสดงในรูปที่ 4

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณเกล็ดเลือด (platelet count) ก่อนและหลังเติม kanamycin ในกลุ่มตัวอย่างเลือดที่เป็น EDTA-PTCP และกลุ่มปกติ (normal)

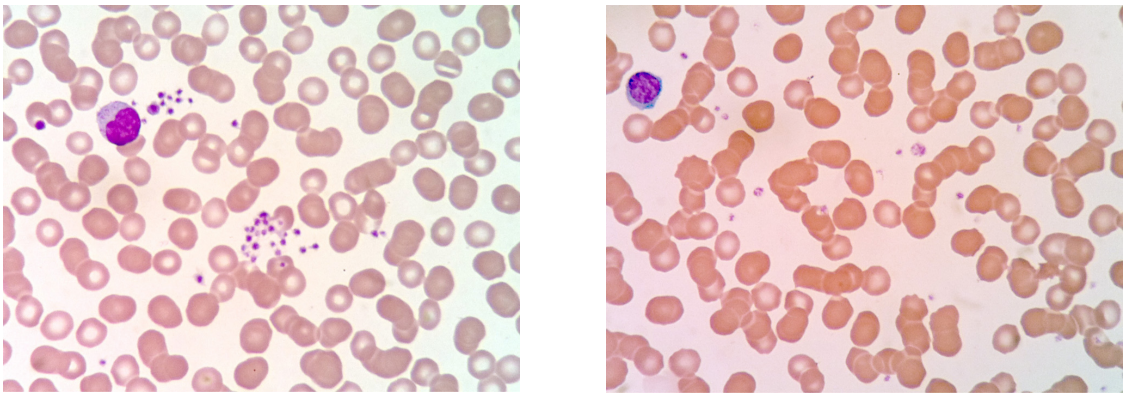
กลุ่มตัวอย่าง	จำนวน (ราย)	Platelet count ($x10^3/\mu L$) ก่อนเติม kanamycin		Platelet count ($x10^3/\mu L$) หลังเติม kanamycin		P-value (paired-t-test)	Relative index (%) (min-max)
		Mean	S.D.	Mean	S.D.		
EDTA-PTCP	130	119.5	87.1	234.5	104.0	<0.001	100-2622.2
Normal	44	249.1	91.5	247.5	95.6	0.299	44.4-106.1



รูปที่ 3 การกระจายของค่าดัชนีความสัมพันธ์ (relative index) ของจำนวนเกล็ดเลือดก่อนและหลังเติมสาร kanamycin ในกลุ่ม EDTA-PTCP และกลุ่มปกติ (normal)

วิจารณ์

EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งที่นิยมใช้ในการเจาะเก็บเลือดเพื่อการทดสอบทางโลหิตวิทยา เพราะมีคุณสมบัติรักษาสภาพของส่วนประกอบภายในเซลล์ รวมถึงรูปร่างลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดได้ดีที่สุด[1,20] อย่างไรก็ตาม EDTA อาจกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดเกาะกลุ่ม ทำให้รายงานค่าการตรวจนับเกล็ดเลือดต่ำกว่าความเป็นจริง ส่งผลกระทบถึงการดูแลรักษาผู้ป่วยได้ มีรายงานการตรวจพบ platelet antibodies ชนิด IgG และ IgM ถึงร้อยละ 83 ในกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบปรากฏการณ์ EDTA-PTCP[4] และพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของ antibodies ต่อ receptor glycoprotein IIb/IIIa เนื่องจากได้ศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย Glanzmann thrombasthenia ซึ่งเป็นกลุ่มโรคที่เกล็ดเลือดบกพร่องคือไม่มี receptor ชนิด GPIIb/IIIa บนผิวเกล็ดเลือด แล้วไม่พบปฏิกิริยานี้[5,7]



A. ก่อนเติม kanamycin B. หลังเติม kanamycin

รูปที่ 4 การกระจายของเกล็ดเลือด การติดสี และรูปร่างลักษณะเซลล์เม็ดเลือด ของกลุ่ม PTCP ก่อน (A) และหลัง (B) เติม kanamycin 5 มิลลิกรัมต่อเลือด 0.5 มิลลิลิตร

ผลการศึกษาครั้งนี้พบภาวะ EDTA-PTCP ร้อยละ 0.04 ซึ่งต่ำกว่ารายงานความชุกของภาวะ EDTA-PTCP ที่ตรวจพบจากการทดสอบประจำวันในห้องปฏิบัติการอื่น เช่น Lippi และ Plebani[8] รายงานการตรวจพบร้อยละ 1.5 Froom และ Barak[16] รายงานการตรวจพบ ร้อยละ 2.7 ในกลุ่มผู้ป่วยนอก การตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP ในผู้ป่วยเพศชายและหญิงเท่าๆ กัน สอดคล้องกับรายงานของ Banfi และ Sawagno[1] ที่รายงานการเกิด EDTA-PTCP ไม่มีความสัมพันธ์กับเพศและอายุ นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ตรวจพบ EDTA-PTCP ในผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่มากกว่าผู้ป่วยเด็ก สอดคล้องกับปริมาณงานการส่งตรวจประจำวันที่สิ่งส่งตรวจมากกว่าร้อยละ 80 เป็นของผู้ใหญ่

การศึกษาในครั้งนี้ที่ตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP ได้มากที่สุดในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการทดสอบในช่วง 60 ถึง 120 นาที หลังการเจาะเก็บเลือด สอดคล้องกับ Lippi และ Plebani[8] ได้สรุปปัจจัยเรื่องเวลาไว้ว่าภาวะ EDTA-PTCP เกิดได้สมบูรณ์ในช่วงเวลา 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง หลังการเจาะเก็บเลือด นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติม kanamycin เพื่อแก้ไขภาวะ EDTA-PTCP สามารถทำได้ในตัวอย่างที่เจาะเลือดมานานกว่า 120 นาที ซึ่งดีกว่า Sakurai และคณะ[18] ที่ได้รายงานไว้ว่าสามารถเติมสาร kanamycin เพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในตัวอย่างตรวจที่เจาะเลือดมานานไม่เกิน 30 นาทีเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยได้เพิ่มขั้นตอนการผสมเลือดให้เข้ากับสาร kanamycin ด้วยเครื่องเขย่าสารที่ระดับความแรง 2,000 รอบต่อนาที ต่อเนื่องนานอย่างน้อย 5 นาที ซึ่งช่วยให้เกล็ดเลือดมีการกระจายตัวดีขึ้น อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการทดลองผสมเลือด EDTA-PTCP โดยไม่เติม kanamycin ด้วยเครื่องเขย่าสารที่ระดับความแรงและเวลาดังกล่าวพบว่าช่วยให้เกล็ดเลือดกระจายตัวได้ดีขึ้นบ้างในรายที่มีการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเล็กน้อย แต่ไม่สามารถทำให้เกล็ดเลือดกระจายตัวได้ในรายที่มีภาวะ EDTA-PTCP ชัดเจน (unpublished observation) จึงสรุปได้ว่าวิธีการแก้ไขภาวะ EDTA-PTCP ให้ได้ผลดีที่สุดจะต้องเติม kanamycin ร่วมกับการผสมเลือดที่ระดับความแรง 2,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จึงจะช่วยให้เกล็ดเลือดกระจายตัวได้ดีที่สุด ผลการศึกษาครั้งนี้พบภาวะ EDTA-PTCP จำนวน 28 ราย ไม่สามารถแก้ไขได้ด้วยวิธีเติมสาร kanamycin ที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น ตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บไว้นาน ปริมาณ

การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมีมาก หรือเป็นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่เกิดจากกระตุ้นด้วยสารกันเลือดแข็งชนิด heparin ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วย[25]

ค่าดัชนีความสัมพันธ์ของจำนวนเกล็ดเลือดก่อนและหลังการเติมสาร kanamycin ได้จากการคำนวณร้อยละของสัดส่วน เกล็ดเลือดหลังการเติมสาร เทียบกับก่อนการเติมสาร ในกลุ่มตัวอย่างปกติที่ไม่มีภาวะ EDTA-PTCP พบว่า 43 ราย มีค่าดัชนีความสัมพันธ์เข้าใกล้ร้อยละ 100 (min-max = 88-106.1) แสดงให้เห็นว่าจำนวนเกล็ดเลือดก่อนและหลังการเติมสาร kanamycin มีค่าใกล้เคียงกัน มีเพียง 1 ราย ที่มีค่าดัชนีความสัมพันธ์ต่างจากกลุ่ม คือ ร้อยละ 44 เนื่องจากจำนวนเกล็ดเลือดมีค่าต่ำมาก ($9x10^3/\mu L$) จึงทำให้มีความแปรปรวนในการตรวจวัด ในขณะที่กลุ่ม EDTA-PTCP มีค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของดัชนีความสัมพันธ์เท่ากับร้อยละ 100 และ 2,622 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของจำนวนเกล็ดเลือดหลังการเติมสาร kanamycin มีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการเติมสาร kanamycin เนื่องจากเกล็ดเลือดที่เกาะกลุ่มมีการกระจายตัวออกมาได้

กลไกที่สาร kanamycin สามารถยับยั้งการเกิดภาวะ EDTA-PTCP ได้นั้นยังไม่มีผู้สรุปไว้อย่างชัดเจน แต่มีรายงานว่า neomycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม amino-glycoside สามารถยับยั้งการหลั่งสาร ADP ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้[26] ดังนั้น kanamycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเดียวกันกับ neomycin จึงอาจอธิบายได้ด้วยปฏิกิริยาเช่นเดียวกันนี้

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ยา kanamycin HCL ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะสำหรับฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ เนื่องจากสามารถจัดหาได้โดยการเบิกจากห้องจ่ายยาของโรงพยาบาล ดังนั้นห้องปฏิบัติการอื่นที่จะนำวิธีนี้ไปใช้ก็สามารถจัดหาสารนี้ได้ แต่เนื่องจากยามีคุณสมบัติเป็นกรดเมื่อเตรียมสเมียร์เลือดจากส่วนผสมของเลือดกับ kanamycin นำไปย้อมสีไรท์ ทำให้สีสเมียร์เลือดเป็นสีค่อนข้างแดง การติดสีของเกล็ดเลือดและนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาวไม่ชัดเจน ต้องแก้ไขด้วยการเพิ่มเวลาในการใส่สีย้อมให้นานขึ้นกว่าเดิมก่อนที่จะเติมบัฟเฟอร์ลงไปผสมกับสี จะช่วยให้การติดสีของเม็ดเลือดทุกชนิดชัดเจนขึ้น

ผลการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยนำไปประยุกต์ใช้ในงานบริการทดสอบนับปริมาณเกล็ดเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยจัดเตรียมหลอดพลาสติกขนาดเล็กบรรจุสาร kanamycin 5 มิลลิกรัมไว้ และกำหนดแนวปฏิบัติว่าเมื่อตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP จากสเมียร์เลือด ให้แบ่งเลือดจากหลอดเลือดเดิม 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ นำไปผสมด้วยเครื่องเขย่าสารที่ระดับความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วทำการตรวจนับปริมาณเกล็ดเลือดด้วยเครื่องอัตโนมัติซ้ำอีกครั้งหนึ่ง พร้อมทั้งตรวจสอบการกระจายตัวของเกล็ดเลือดจากสเมียร์เลือดเพื่อยืนยันการรายงานผลด้วยทุกครั้ง วิธีนี้ทำให้สามารถรายงานผลจำนวนเกล็ดเลือดได้อย่างถูกต้องโดยไม่ต้องขอเจาะเลือดผู้ป่วยซ้ำ และถ้าพบว่าการเติมสาร kanamycin แล้วไม่สามารถแก้ไขภาวะ EDTA-PTCP ได้ ควรเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำใหม่โดยใช้ 3.2% sodium citrate หรือ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว อย่างไรก็ตามวิธีที่ดีที่สุดคือการเจาะเลือดจากปลายนิ้วแล้วเตรียมสเมียร์เลือดทันที หากไม่เห็นเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มก็สามารถนับเกล็ดเลือดจากสเมียร์เลือดได้ หรืออาจดูดเลือดจากปลายนิ้วผสมกับน้ำยา 1.0% ammonium oxalate ในอัตราส่วนเลือดต่อน้ำยาเท่ากับ 1 ต่อ 200 และนำมานับเกล็ดเลือดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ได้[27]

สรุป

ความชุกของภาวะ EDTA-PTCP ที่ตรวจพบที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ คิดเป็นร้อยละ 0.04 เมื่อตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP สามารถแก้ไขได้ด้วยการเติม kanamycin 5 มิลลิกรัม ลงในเลือด 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องเขย่าสารที่ระดับความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จะทำให้เกล็ดเลือดกระจายตัวได้ดี สามารถนับจำนวนเกล็ดเลือดได้แม่นยำ วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถแบ่งเลือดจากหลอดเลือดเดิมมาทำการทดสอบได้โดยไม่ต้องเจาะเลือดผู้ป่วยซ้ำ

เอกสารอ้างอิง

1. Banfi G, Sawagno GL. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. Clin Chem Lab Med 2007; 45: 565 - 76.
2. Konkle BA. Disorders of platelets and vessel Wall. In: Longo DL, editor. Harrison's hematology and oncology. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2013; p.236 - 46.
3. Lichtman MA, Kaushansky K, Kipps TJ, et al. Williams manual of hematology. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
4. Pegels JG, Bruynes EC, Engelfriet CP, et al. Pseudo-thrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. Blood 1982; 59: 157 - 61.
5. Casonato A, Bertomoro A, Pontara E, et al. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by anti-bodies against the cytoadhesive receptor of platelet gpIIB-IIIA. J Clin Pathol 1994; 47: 625 - 30.
6. Braester A. Pseudothrombocytopenia as a pitfall in the treatment of essential thrombocythemia. Eur J Haematol 2003; 70: 251 - 2.
7. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, et al. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. Int J Lab Hemato 2007; 29: 4 - 20.
8. Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseudothrombo-cytopenia further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. Clin Chem Lab Med 2012; 50: 1281 - 5.
9. Choe WH, Cho YU, Chae JD, et al. Pseudothrombo-cytopenia or platelet clumping as a possible cause of low platelet count in patients with viral infection: a case series from single institution focusing on hepatitis A virus infection. Int J Lab Hemato 2013; 35: 70 - 6.
10. Senthilkumaran S, Menezes RG, Jena NN, et al. Pseudothrombocytopenia in perioperative patient: a significant laboratory artifact. J Anaesthesiol Clin Pharmacol 2013; 29: 553 - 4.
11. Lavender RC, Salmon JS, Golden WE. Pseudothrombo-cytopenia in an elderly preoperative patient. Anesth Analg 1989; 69: 396 - 7.
12. Bay A, Sivasli E, Taviloglu S, et al. Transplacental transmission of EDTA dependent pseudothrombo-cytopenia in a neonate. Open J Pediatr 2011; 1: 39 - 40.
13. Ohno N, Kobayashi M, Hayakawa S, et al. Transient pseudothrombocytopenia in a neonate: transmission of a maternal EDTA-dependent anticoagulant. Platelets 2012; 23: 399 - 400.
14. Christensen RD, Sola MC, Rimsza LM, et al. Pseudothrombocytopenia in a preterm neonate. Pediatrics 2004; 114: 273 - 5.
15. Karaman E, Karaman K. A case of term pregnant woman with pseudothrombocytopenia: an overlooked phenomenon. Br J Med Res 2015; 6: 1196 - 200.
16. Froom P, Barak M. Prevalence and course of pseudo-thrombocytopenia in outpatients. Clin Chem Lab Med 2011; 49: 111 - 4.
17. Bizzaro N. EDTA-dependent pseufothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. Am J Hematol 1995; 50: 103 - 9.
18. Sakurai S, Shiojima I, Tanigawa T, et al. Amino-glycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudo-thrombocytopenia. Br J Haematol 1997; 99: 817 - 23.
19. van der Meer W, Allebes W, Simon A, et al. Pseudo-thrombocytopenia: a report of a new method to count platelets in a patient with EDTA- and temperature-independent antibodies of the IgM type. Eur J Haematol 2002; 69: 243 - 7.
20. Hoffmann JJ. EDTA-induced pseudo-neutropenia resolved with kanamycin. Clin Lab Haematol 2001; 23: 193 - 6.
21. Jeon IS, Yang SW. Prevention and dissociation of the platelet aggregation in a patient with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia by supplementation of kanamycin: a case report. Korean J Pediatr 2005; 48: 675 - 7.
22. Zhou X, Wu X, Deng W, et al. Amikacin can be added to blood to reduce the fall in platelet count. Am J Clin Pathol 2011; 136: 646 - 52.

23. Chae H, Kim M, Lim J, et al. Novel method to dissociate platelet clumps in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia based on the pathophysiological mechanism. Clin Chem Lab Med 2012; 50: 1387 - 91.
24. Sysmex Corporation. Automated hematology analyzer XT-2000i/XT-1800i instructions for use. Kobe: The Corporation; 2010.
25. Prechel M, Walenga JM. Heparin-induced thrombocytopenia: and update. Semin Thromb Hemost 2012; 38: 483 - 96.
26. Yusnes OB, Steen VM, Holmsedn H. Neomycin inhibits platelet functions and inositol phospholipid metabolism upon stimulation with thrombin, but not with ionomycin or 12-O-trtradecanoyl-phorbol 13 acetate. Eur J Biochem 1988; 177: 219 - 23.
27. Bauer JD, Ackermann PG, Toro G. Clinical laboratory methods. 8th ed. Saint Louis: Mosby; 1974.