บทบรรณาธิการ

วิทยาการก้าวหน้าของเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Advanced Technology in Automated Blood Cell Analyzer)

พรรณี บุตรเทพ

การตรวจวิเคราะห์ส่วนประกอบของเลือดในทางโลหิตวิทยาหรือ complete blood count (CBC) ประกอบไปด้วยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของส่วนประกอบต่างๆ ของเลือด การตรวจสอบจำนวนและแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว และการตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติถือเป็นความก้าวหน้าของเทคโนโลยีที่ทำให้ลดขั้นตอนต่างๆ ลง ได้แก่ การเจือจางเลือด การนับจำนวนเม็ดเลือด การไถและการย้อม blood smear เป็นต้น จึงทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วโดยในเครื่องบางรุ่น (model) อาจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้ในเวลาน้อยกว่า 1 นาที ต่อ 1 ตัวอย่าง และบางรุ่นจะมีส่วนที่ smear และย้อม slide เป็น option ของเครื่อง

เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางโลหิตวิทยาประกอบไปด้วยเครื่องหลายชนิดและในแต่ละชนิดยังมีหลายรุ่น ซึ่งนอกจากจะสามารถวิเคราะห์ส่วนประกอบที่เป็นพื้นฐานในทางโลหิตวิทยาหรือ CBC แล้ว ยังสามารถตรวจสอบและรายงาน parameters อื่นๆ ได้แก่ เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนระยะ reticulocyte และเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีนิวเคลียส (nucleated red blood cells; NRBC) และยังสามารถตรวจสอบ parameters อื่น เช่น red cell distribution width (RDW), platelet distribution width (PDW) และ neutrophil volume distribution width (NDW) เป็นต้น

เครื่องวิเคราะห์และแยกชนิดของเม็ดเลือดในปัจจุบันจะใช้เทคโนโลยีหลายอย่างร่วมกัน ได้แก่ การใช้คอมพิวเตอร์มาช่วยในการวิเคราะห์และคำนวณผล การใช้แสงเลเซอร์และคลื่นวิทยุมาช่วยในการตรวจวิเคราะห์ เป็นต้น สำหรับคุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัตินั้นจะอาศัยคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ คุณสมบัติทางด้านเคมีของเซลล์ (cyto-chemistry) การกระจายแสงของเซลล์ (cell light scatter) และการเป็นสื่อนำไฟฟ้าของเซลล์ (cell conductivity) โดยใช้อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ร่วมกัน ทำให้ได้ข้อมูลจากการวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดได้มากขึ้น Parameters เหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในส่วนของการวินิจฉัยแยกชนิดของโรค การติดตามผลการรักษาตลอดจนการวิจัย

หลักการของเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Principles of automated hematology analyzer)

เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ มีการนำหลักการหลายอย่างมาใช้ร่วมกันเพื่อให้สามารถทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้หลากหลาย มีความแม่นยำและถูกต้อง ปัจจุบันหลักการต่างๆที่นำมาใช้ในเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติได้แก่

1. Hydrodynamic Focusing

หลักการนี้คือ เมื่อเลือดถูกเจือจางด้วยน้ำยาแล้วถูกส่งไปยังช่องนับเม็ดเลือด ขณะที่เซลล์ผ่านไปยัง aperture เซลล์เม็ดเลือดจะถูกบังคับให้ไหลเรียงเดี่ยวด้วยการใช้น้ำยาที่มีความเข้มข้นและแรงดันที่แตกต่างกัน หรือที่เรียกว่า front sheath ดังนั้นเซลล์แต่ละตัวจะถูกนับทีละเซลล์ และเมื่อเซลล์ถูกนับและผ่าน aperture ไปแล้ว เซลล์ที่ถูกนับแล้วจะถูกบังคับให้ไหลเรียงเดี่ยวออกไปด้วยการใช้น้ำยาที่มีความเข้มข้นและแรงดันที่แตกต่างกันเรียกว่า back sheath ด้วยหลักการนี้ทำให้การวิเคราะห์เม็ดเลือดถูกต้องและแม่นยำ เนื่องจากแต่ละเซลล์จะถูกนับเพียงครั้งเดียวเท่านั้นไม่มีเซลล์ใดถูกนับซ้ำ เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติส่วนใหญ่จะนำหลักการนี้มาใช้ร่วมกับหลักการอื่น

2. Impedance Cell Counting and Sizing

การวัดการเปลี่ยนแปลงของการต้านกระแสไฟฟ้าของเม็ดเลือด (electrical resistance) เมื่อไหลผ่าน aperture ที่มีไฟฟ้ากระแสตรง (direct current) ไหลผ่าน สามารถบอกจำนวนเซลล์ที่นับได้ และขณะเดียวกันก็สามารถบอกขนาดหรือปริมาตรของเซลล์ได้ โดยอาศัยหลักการว่าอัตราการลดของกระแสไฟฟ้าที่เซลล์เข้าไปขัดขวางทางผ่านจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรของเซลล์

3. Light - Scatter

หลักการนี้อาศัยคุณสมบัติของเซลล์เม็ดเลือดที่มีดัชนีการ

ได้รับต้นฉบับ 4 ธันวาคม 2551 ให้ลงตีพิมพ์ 23 ธันวาคม 2551

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ. ดร. พรรณี บุตรเทพ ศูนย์วินิจฉัยโรคเลือด หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระรามหก เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 E-mail : rapbt@mahidol.ac.th

หักเหแสง (refractive index) แตกต่างกัน เมื่อฉายลำแสง (light beam) ได้แก่ laser ที่ปรับให้เล็กลงและโฟกัสไปที่เซลล์ เซลล์จะหักเหแสงให้กระจาย (scattered) ออกไป และโดยการบันทึกปริมาณของ light scatter ที่มุมต่างองศาโดยการบันทึกที่มุมต่ำ (low angle) จะได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับขนาดของเซลล์ ส่วนการบันทึกที่มุมสูง (high angle) จะได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของสารที่อยู่ภายในเซลล์นั้น ตลอดจน structural complexity ที่อยู่ในเซลล์ ได้แก่ granules และ nuclear shape เป็นต้น

4. Light Absorption

หลักการนี้อาศัยการย้อมเซลล์โดยปฏิกิริยาเคมีต่อเซลล์ (cytochemistry) โดยจะย้อมส่วนแกรนูลของเม็ดเลือดขาวในการติดสี peroxidase เพื่อใช้ในการแยกชนิดต่างๆ ของเม็ดเลือดขาวให้ครบ 5 ชนิด และนอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบ hemoglobin concentration

5. Electrical Conductivity

ใช้วัดความเป็นสื่อนำกระแสไฟฟ้าของเซลล์เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าที่มีความถี่สูงโดยใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic wave) ชนิดที่มีความถี่สูงในการตรวจคุณสมบัติการนำกระแสไฟฟ้าของเซลล์ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี แต่ผ่านสิ่งต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น แกรนูล นิวเคลียส และสารองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ได้ไม่ดี เทคโนโลยีนี้จึงเหมาะสำหรับใช้เพื่อแยกชนิดของ granulocytes

6. Radio Frequency

เป็นวิธีการที่ใช้คลื่นวิทยุเข้าไปตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ เพื่อช่วยในการแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว หลักการคือ คลื่นวิทยุนี้สามารถจะเคลื่อนตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และ cytoplasm ได้ แต่เมื่อถึงนิวเคลียสคลื่นวิทยุจะถูกขัดขวางไว้ โดยการขัดขวางนี้จะขึ้นอยู่กับขนาดและความหนาแน่นของนิวเคลียส โดยนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่และมีความหนาแน่นสูงจะขัดขวางคลื่นวิทยุได้มากและจะสร้างสัญญาณสูง หลักการนี้จะทำให้สามารถแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใกล้เคียงกันแต่มีความแตกต่างของแกรนูล และนิวเคลียสออกจากกันได้ โดยเฉพาะการแยก granulocyte ออกจาก monocyte

7. Light scattering และ Multi-angle polarized scatter separation (M. A. P. S. S.)

เป็นหลักการวัดการกระจายแสง laser จากเซลล์ โดยมีตัวรับแบบแบ่งแยกหลายมุม วิธีการคือโดยการยิงแสง laser ไปที่เซลล์ขณะไหลผ่าน flow cell แบบเรียงเดี่ยว ขณะเดียวกันเมื่อเซลล์กระจายแสง เครื่องจะมีตัวตรวจรับ (detector) ตั้งที่มุมต่างกัน โดยข้อมูลที่ได้รับจาก detector ทั้งหมดจะสามารถนำไปวิเคราะห์และแยกชนิดเม็ดเลือดขาวได้ทั้ง 5 ชนิด

8. Fluorescence

เครื่องวิเคราะห์รุ่นใหม่จะนำ fluorescence มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของ RNA ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ reticulocytes และ “reticulated” platelets และวิเคราะห์ปริมาณของ DNA เพื่อการวิเคราะห์ nucleated red blood cells ตลอดจนวิเคราะห์ cell surface markers ได้แก่ CD4 และอื่นๆ

การประเมินค่า parameters ทางโลหิตวิทยาโดยเครื่องอัตโนมัติ

เครื่องอัตโนมัติจะทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ โดยการแยกวิเคราะห์เป็นส่วนๆ โดยเครื่องจะแบ่งตัวอย่างเลือดบางส่วนไปทำให้เกิดการ lysis เพื่อวัด Hb และวิเคราะห์เม็ดเลือดขาว แต่บางส่วนจะถูกนำไปเจือจางโดยไม่เกิด lysis เพื่อวิเคราะห์ RBC และ PLT ค่าที่ได้บางค่าได้จากการวิเคราะห์โดยตรงตามหลักการที่กล่าวมาแล้ว บางค่าได้จากการคำนวณจาก primary data เช่น Hct, MCH และ MCHC เป็นต้น ทำให้ได้ค่าการวิเคราะห์ประมาณ 20 ถึง 30 parameters

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือเพื่อทำให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าเชื่อถือ การใช้หลักการหลายอย่างร่วมกันนี้ ทำให้สามารถวิเคราะห์แยกชนิดของเม็ดเลือดขาวได้ครบทั้ง 5 ชนิดได้แก่ neutrophil, eosinophil, basophil, monocyte และ lymphocyte เทคโนโลยีใหม่ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นลิขสิทธิ์ของแต่ละบริษัทที่ผลิต ซึ่งมีหลักการต่างๆ ดังนี้

Electrical impedance และ Volume Conductivity Scatter (VCS)

เป็นการวิเคราะห์แยกชนิดของเม็ดเลือดขาวโดยอาศัยหลักการของ cell volume ร่วมกับ cell conductivity และ cell light scatter รวมกันอยู่ใน single integrated system เรียกว่า VCS technology ทำให้สามารถวิเคราะห์แยกชนิดของเม็ดเลือดขาวจำนวน 5 ชนิดได้ โดยกลุ่มของเซลล์ที่แสดงจะแยกออกเป็น neutrophil, eosinophil, monocyte และ lymphocyte หรือ basophil เมื่อวิเคราะห์ระหว่าง volume และ scatter และเมื่อวิเคราะห์ระหว่าง volume และ conductivity จะสามารถแยก lymphocyte ออกไปได้ และจากการวิเคราะห์ volume ร่วมกับ conductivity/scatter จะทำให้สามารถแยก basophil ออกไปได้ จึงวิเคราะห์เม็ดเลือดขาวได้ครบทั้ง 5 ชนิด เทคโนโลยีนี้เป็นของบริษัท Coulter ได้แก่ Model STKS และ MAXM

Light scattering และ Cytochemical analysis

เป็นการแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวโดยเม็ดเลือดขาวจะถูกย้อมด้วย peroxidase ใน chamber ที่มีความร้อนสูงเพื่อให้เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดแตก โดยใช้ light scatter ในการวัด

ขนาดของเม็ดเลือดขาว และใช้ tungsten light optics ในการวัด peroxidase activity สำหรับ marker ที่ใช้ในการแยกเม็ดเลือดขาวชนิด granulocytes จะใช้ enzyme myeloperoxidase ซึ่งจะพบว่ามีอยู่ในระดับที่แตกต่างกันใน neutrophil, eosinophil และ monocyte แต่จะไม่พบใน basophil, lymphocyte และ blast cell

สำหรับการวิเคราะห์ basophil นั้นจะใช้น้ำยาพิเศษทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดขาวทุกชนิดยกเว้น basophil โดยเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นจะแตกสลายเหลือแต่ส่วนนิวเคลียส ในขณะที่ basophil จะยังอยู่ในสภาพปกติ เมื่อเซลล์เหล่านี้ผ่านไปที่ flow cell ที่มีแสง laser ผ่านก็จะถูกวิเคราะห์ว่าเป็น mononuclear cell หรือ polymorphonuclear cell ในขณะที่ basophil จะยังคงมีขนาดใหญ่กว่านิวเคลียสอื่น จึงสามารถกระจายแสงได้มากกว่า และปรากฏใน scattergram ส่วนบนของแกนตั้ง ในขณะที่ส่วนล่างของ scattergram จะแสดงลักษณะของนิวเคลียส ของเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น

การวิเคราะห์เม็ดเลือดขาวโดยวิธีนี้ยังสามารถรายงานความผิดปกติอื่นๆ ได้แก่ กลุ่มที่มี high myeloperoxidase (HPX fraction) และกลุ่มของ large unstained cells (LUC) โดยการมี increased myeloperoxidase activity จะเกี่ยวข้องกับ reactive stages หรือการมี hyperproliferative granulopoiesis ในขณะที่การมีจำนวนของ LUC สูงขึ้นจะสะท้อนถึงการมี atypical lymphocytes และ blast cells เทคโนโลยีนี้ใช้กับเครื่อง ADVIA 120 และ ADVIA 2120 เป็นต้น

Radio Frequency และ Direct Current (RF/DC)

เป็นการวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณของเม็ดเลือดขาวโดยใช้ไฟฟ้ากระแสตรงและคลื่นวิทยุ ซึ่งจะสะท้อนข้อมูลด้านขนาดและความหนาแน่นของนิวเคลียส ทำให้สามารถแยกเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ออกเป็น granulocyte, monocyte และ lymphocyte โดยคลื่นวิทยุจะตรวจความหนาแน่นและขนาดของนิวเคลียสจาก lyse-treated cells ในขณะที่ไฟฟ้ากระแสตรงจะตรวจนิวเคลียสและ cytoplasm จากเซลล์ที่สมบูรณ์ โดยสัญญาณจะแสดงในลักษณะ three-dimensional WBC scattergram ส่วน eosinophil จะถูกแยกออกจากกลุ่ม granulocytes ด้วยน้ำยาจำเพาะ โดยอาศัยคุณสมบัติที่ eosinophil จะทนต่อน้ำยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างได้ดีกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นและในทำนองเดียวกันก็สามารถแยก basophil ได้ด้วยหลักการที่ basophil มีความคงทนต่อน้ำยาที่มีฤทธิ์เป็นกรดได้ดีกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น นอกจากนี้เม็ดเลือดที่ผิดปกติอื่นๆ ได้แก่ immature granulocytes (shift to the left), blasts cells, atypical lymphocytes, nucleated RBCs และ platelet clumping ก็สามารถตรวจได้จาก WBC scattergram

หลักการ RF/DC นี้ ยังสามารถวิเคราะห์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนได้ โดยใช้น้ำยาพิเศษ โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ว่า ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนจะประกอบด้วยโปรตีนมากกว่าไขมัน น้ำยานี้จะทำลายเม็ดเลือดขาวตัวแก่ทั้งหมด ทำให้แยกเม็ดเลือดขาวตัวอ่อน (hematopoietic progenitor cells; HPC) ออกมาได้ เทคโนโลยีนี้เป็นของบริษัท Sysmex ได้แก่รุ่น XE series และรุ่น SE-9000, SE-9500 เป็นต้น

Light scattering และ Multi-Angle Polarized Scatter Separation (M.A.P.S.S.)

หลักการนี้คือ เมื่อเม็ดเลือดขาวไหลผ่าน flow cell ที่มีแสงเลเซอร์ยิงผ่าน เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการกระจายแสงแตกต่างกัน และการกระจายแสงเลเซอร์จากเซลล์ต่างๆ จะถูกตรวจด้วยตัวรับ (detector) ที่มุมต่างกันได้แก่ ที่ 0 องศา จะ detect ขนาดของเซลล์ ที่ 7 หรือ 10 องศา จะ detect complexity ภายในเซลล์ ที่ 90 องศา polarized จะ detect lobularity ของนิวเคลียส และที่ 90 องศา depolarized จะ detect แกรนูลของ eosinophil โดยข้อมูลที่ได้รับจาก detector ทั้งหมดจะปรับเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าเพื่อนำไปวิเคราะห์แยกชนิดโดยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยการวิเคราะห์จะเป็นแบบ two angle analysis ได้แก่ ที่ 7 และ 90 องศา จะแยกระหว่าง polymorpho nuclear และ mononuclear cells ที่ 90 องศา (polarized และ depolarized) จะแยกระหว่าง neutrophil และ eosinophil ที่ 0 และ 7 องศา จะแยก basophil, lymphocyte และ monocyte และจากหลักการดังกล่าวทำให้นับแยกประเภทเม็ดเลือดขาวได้ครบทั้ง 5 ชนิด เทคโนโลยีนี้เป็นของบริษัท Abbott เช่น CELL DYN รุ่น 3700 และ 4000 เป็นต้น

Parameters อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับ WBC

เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีที่สามารถวิเคราะห์ parameters อื่นนอกเหนือจากการนับแยกชนิดและปริมาณของเม็ดเลือดขาว 5 ชนิด ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการแปลผลการวิเคราะห์เพื่อวินิจฉัย บางค่าสามารถนำไปใช้ในการวิจัยและพัฒนา หรือติดตามการรักษาได้ parameters ดังกล่าวได้แก่

Large unstained cell (LUC) หมายถึงกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และไม่ติดสี peroxidase ที่ใช้ย้อมเซลล์ ได้แก่ atypical lymphocyte, large lymphocyte และ blast cell เป็นต้น ซึ่งหากค่านี้สูงผิดปกติ จำเป็นต้องตรวจสอบ blood smear ค่านี้มีรายงานในเครื่อง Technicon H*1, H*2, H*3, ADVIA 120 และ ADVIA 2120 ค่าปกติของ LUC อยู่ระหว่าง 0-3.7%

Mean peroxidase activity index (MPXI) เป็นค่าดัชนีเฉลี่ยของกลุ่มเซลล์ที่ติดสี peroxidase ค่านี้เป็นค่าที่ใช้ในการศึกษาการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ว่ามีระดับเฉลี่ยของเอนไซม์ myeloperoxidase ปกติหรือไม่ ซึ่งค่าสูงพบได้ในกรณีที่มีเซลล์ตัวอ่อนของเม็ดเลือดขาว เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ (shift to the left) ค่านี้มีรายงานในเครื่อง Technicon H*1, H*2, H*3, ADVIA 120 และ ADVIA 2120 ค่าปกติของ MPXI อยู่ระหว่าง -10 ถึง 10

Immature granulocyte (IG) เป็นค่าที่รายงานในเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติขนาดใหญ่ เช่น เครื่อง Sysmex XE-2100 และเครื่อง Cell-Dyn 4000 โดยรายงานค่าเป็นร้อยละ (%) หรือค่าสัมบูรณ์ (absolute value) ซึ่งในภาวะปกติไม่ควรพบโดยค่า IG จะเท่ากับ 0 ค่าของ IG จะสูงขึ้นในภาวะที่ผิดปกติ เช่นมี shift to the left หรือ leukemia เป็นต้น

Lobularity index (LI) เป็นค่าที่เกิดจากการวิเคราะห์หาจำนวนของ basophil โดยหลักการของบริษัท Technicon โดยวิเคราะห์จากกลุ่มเซลล์ที่มีนิวเคลียสหลาย lobe (polymorphonuclear; PMN) เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่มีนิวเคลียส lobe เดียว (mononuclear; MN) ใน basophil/ lobularity cytogram ค่าที่ต่ำกว่าปกติแสดงถึง การมี shift to the left ในขณะที่ค่าสูงขึ้นแสดงถึง การมี shift to the right โดยค่าปกติจะเท่ากับ 1.90-3.00

Hematopoietic progenitor cell (HPC) เป็นค่าวิเคราะห์เซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือด โดยเครื่องรุ่นใหม่ของบริษัท Sysmex ได้แก่ Sysmex XE-2100ได้พัฒนาการวิเคราะห์ค่าเซลล์ดังกล่าว ซึ่งเป็นค่าที่สามารถนำมาใช้ในทางคลินิกได้

CD4/ CD8 เป็นค่าที่เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดบางรุ่นสามารถวิเคราะห์ได้ เช่นเครื่อง Coulter STKS, GENS และเครื่อง Cell-Dyn 4000 เป็นต้น ค่า CD4/ CD8 เป็นค่าวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte คือ T-helper (CD4+) และ T-suppressor (CD8+) ซึ่งจะช่วยในการติดตามการรักษาผู้ป่วยที่มีปัญหาทางด้านภูมิคุ้มกันเช่นโรคเอดส์ ค่าปกติของ T-helper (CD4+) 600-1500 cells/mL และ T-suppressor (CD8+) 300-1000 cells/mL ซึ่งโดยค่าปกติของ CD4/CD8 จะมากกว่า 1.0

Neutrophil volume distribution width (NDW) เป็นค่าที่ใช้เป็น indicator เพื่อช่วยในการวินิจฉัย acute infection เป็นค่าที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่อง Coulter LH 750 โดยวิธี VCS เทคโนโลยี โดยพบว่าค่า NDW จะสูงขึ้นในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งแสดงถึงการมี neutrophil size variability

Parameters อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับ platelets

Mean platelet volume (MPV) คือค่าเฉลี่ยปริมาตรของเกล็ดเลือด จะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงขนาดของเกล็ดเลือด ซึ่ง MPV จะ equivalent กับ MCV โดยค่าที่เพิ่มขึ้นของ MPV จะทำให้สามารถแยกระหว่าง normal และ abnormal platelet populations MPV มีหน่วยเป็น fL โดยค่าปกติของ MPV คือ 7.2-11.1 fL

Platelet distribution width (PDW) คือค่าความกว้างของการกระจายตัวของปริมาตรเกล็ดเลือด จะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความแตกต่างของขนาดของเกล็ดเลือด ซึ่ง PDW จะ equivalent กับ RDW โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของ PDW จะทำให้สามารถแยกระหว่าง normal และ abnormal platelet populations เช่นเดียวกัน PDW มีหน่วยเป็นร้อยละ (%)

Plateletcrit (PCT) คือค่าปริมาตรอัดแน่นเกล็ดเลือดเป็นค่าที่ equivalent กับ Hct แต่เป็นค่าที่ยังไม่ทราบประโยชน์แน่ชัด ค่าปกติอาจแตกต่างกันได้ตามเทคโนโลยีที่ใช้วิเคราะห์ PCT มีหน่วยเป็นร้อยละ (%)

Platelet large cell ratio (P-LCR) เป็นค่าอัตราส่วนระหว่างเกล็ดเลือดที่มีขนาดน้อยกว่า 12 fL และที่มีขนาดมากกว่า 12 fL ซึ่งหากต่ำกว่าปกติใช้เตือนการเกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด สามารถนำมาใช้ติดตามสภาวะการสร้างเกล็ดเลือด

Parameters ที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน

Nucleated red blood cell (NRBC) คือค่าจำนวนของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีนิวเคลียส เป็นค่าที่วิเคราะห์ได้โดยเครื่องอัตโนมัติรุ่นใหม่ ได้แก่เครื่อง Sysmex XE-2100, Cell-Dyn 4000 และ coulter LH 750 หลักการวิเคราะห์ในแต่ละเครื่องจะแตกต่างกันไป ได้แก่โดยการสลายเม็ดเลือดแดงทั้งหมดโดยน้ำยาเฉพาะ ซึ่งทำให้ NRBC เหลือแต่นิวเคลียสที่มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดขาว ทำให้สามารถนับ NRBC ได้ หรือโดยใช้หลักการของ Flow cytometry โดยการย้อมด้วย CD45 และ propidium iodide (PI) โดย NRBC จะให้ผลเป็น CD45-/PI+ NRBC เป็นค่าที่มีประโยชน์ในการวินิจฉัยและติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคโลหิตจางบางชนิด ได้แก่ โรคธาลัสซีเมีย NRBC มีหน่วยเป็นร้อยละ (%) หรือค่าสัมบูรณ์ (cells/mL) ค่าปกติคือ NRBC = 0

Reticulocytes count (RET count) เป็นค่านับจำนวนเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไม่มีนิวเคลียส การวิเคราะห์โดยหลักการของ Sysmex จะย้อม reticulocyte ด้วย Auramine O (ย้อม nucleic acid) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ DNA และ RNA หลักการคือให้เซลล์ไหลเรียงเดี่ยวไปยัง flow cell โดยยิงแสงเลเซอร์ชนิด Argon ทำให้เซลล์เกิดการกระจายแสงตามคุณสมบัติสองประการคือ ขนาดของเซลล์ และความเข้มข้นของการติดสีเรืองแสง โดยเซลล์ที่ถูกย้อมด้วยสีเรืองแสงจะปล่อยแสงเรืองออกมาเมื่อกระทบ laser แสงเรืองที่ออกมาจะถูกวัดด้วย photomultiplier โดยที่ reticulocyte

จะมี nucleic acid ชนิด RNA เหลืออยู่จึงกระจายแสง สำหรับ NRBC จะติดสีเข้มมากเพราะมี nucleic acid ในนิวเคลียสสูง จะถูกแยกออกไป สำหรับการวิเคราะห์โดยเครื่อง H*3 RTC/RTX และ ADVIA จะย้อม nucleic acid ใน reticulocyte ด้วยสี OXAZINE 750 ร่วมกับการใช้น้ำยา Zwitterionic detergent ที่ทำให้เซลล์มีรูปร่างกลมโดยคงปริมาตรไว้ (isovolumetric sphere)

การนับจำนวน reticulocyte นอกจากจะวัดจำนวนได้อย่างถูกต้องแล้ว ยังสามารถตรวจสอบ maturity ของ reticulocyte ได้โดยการตรวจสอบปริมาณของ RNA ค่า RET count และ RET maturity index ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจวินิจฉัยและติดตามการรักษาภาวะโลหิตจางจากสาเหตุต่างๆ เพราะสามารถบ่งบอกถึงการทำงานของไขกระดูก RET count มีหน่วยเป็นร้อยละ (%) หรือค่าสัมบูรณ์ ($x10^3$/mL)

Parameters อื่น ที่เกี่ยวกับ reticulocytes

Low fluorescence ratio (LFR) คือค่าของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ย้อมติดสีฟลูออเรสเซนต์ในปริมาณต่ำ

Middle or medium fluorescence ratio (MFR) คือค่าของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ย้อมติดสีฟลูออเรสเซนต์ในปริมาณปานกลาง

High fluorescence ratio (HFR) คือค่าของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ย้อมติดสีฟลูออเรสเซนต์ในปริมาณสูง

Immature reticulocyte fraction (IRF) เป็นค่าที่ประกอบด้วยกลุ่ม HFR และ MFR สามารถนำมาใช้ในการศึกษาพยาธิสรีระของการสร้างเม็ดเลือดแดง ค่า IRF รายงานได้จากเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติที่ผลิตออกมาในรุ่นปัจจุบัน ได้แก่ เครื่อง Sysmex 2100 และ Cell-Dyn 4000 เป็นต้น ค่า IRF สามารถนำมาใช้ในการติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคโลหิตจางได้

Reticulocyte mean corpuscular volume (MCVr) คือค่าเฉลี่ยของปริมาตรเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) มีหน่วยเป็น fL

Reticulocyte mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCMr) คือค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) มีหน่วยเป็น g/dL

Reticulocyte hemoglobin content (CHr) คือค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) มีหน่วยเป็น pg

Reticulocyte hemoglobin distribution width (HDWr) คือค่าความกว้างของการกระจายตัวของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) มีหน่วยเป็น g/dL

Reticulocyte distribution width (RDWr) คือค่าความกว้างของการกระจายตัวของปริมาตรเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) มีหน่วยเป็นร้อยละ (%)

การตรวจวิเคราะห์ทางด้านโลหิตวิทยาเป็นการตรวจพื้นฐานที่สำคัญทั้งในด้านการตรวจเพื่อวินิจฉัย และติดตามการรักษาผู้ป่วย ในปัจจุบันเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติได้รับการพัฒนาจนมีความถูกต้องและแม่นยำสูง และมีความสะดวกรวดเร็ว การเข้าใจหลักการวิเคราะห์จะทำให้ผู้วิเคราะห์สามารถปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติก็ยังคงมีข้อจำกัดบางประการในการบ่งชี้ถึงความผิดปกติของตัวอย่างที่นำมาตรวจ ดังนั้นการผสมผสานเทคโนโลยีเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติร่วมกับการตรวจ blood smear ก็จะทำให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำขึ้นโดยเครื่องบางรุ่นจะมีส่วนที่ smear และย้อม slide เป็น option ของเครื่องได้แก่ Coulter LH 785 และ LH 780 เป็นต้น นอกจากนี้ขบวนการในการควบคุมคุณภาพ (quality control) และการปรับแต่ง (calibration) ของเครื่องก็เป็นส่วนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับเครื่องอัตโนมัติ ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือ

อย่างไรก็ตามหลักการสำหรับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติเหล่านี้ blood cells ก็คือ particles ที่มีความแตกต่างกันของขนาด impedance และ light scatter ที่เครื่องกำหนดความถูกต้องในการวิเคราะห์แต่ในความเป็นจริงอาจมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์จึงอาจพบข้อผิดพลาดของผลการวิเคราะห์ได้ ซึ่งความผิดพลาดอาจเกิดได้จาก 2 สาเหตุคือจากหลักการของเครื่องหรือเทคโนโลยีที่ใช้วิเคราะห์นั้นโดยมีผู้รายงานไว้ว่าเครื่องแต่ละชนิดจะมีข้อผิดพลาดได้อย่างน้อย 1 ส่วน อีกสาเหตุหนึ่งก็คือพยาธิสภาพของผู้ป่วยที่ส่งผลต่อตัวอย่างที่เก็บและมีผลต่อการวิเคราะห์ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตาราง

ข้อผิดพลาดของผลการวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติทางโลหิตวิทยา

Spurious counts and spurious results on hematology analyzers

Situations leading to	สาเหตุ	โรคที่พบ
Spuriously Low PLT Count	PLT agglutination (in EDTA)	Septicemia, TTP
	PLT satellitism (in EDTA)	Autoimmune antibody
	Around PMN, Around other cells	Chronic myelocytic leukemia
	PLT-neutrophil agglutination	
Spuriously Elevated PLT Count	Fragmented RBC (schistocyte)	Severe iron deficiency anemia
	Cytoplasmic fragment of nucleated cells	Leukemia, Lymphoma Infection, Candida
	Microorganism (Bacteria, Fungi)	Hyperchylomicronemia
	Lipids	
Spuriously Low WBC Count	Polymorphonuclear aggregation	Acute / chronic inflammation
		Liver disease, integrin expression
	Aggregation ของ WBC อื่นๆ	
	Cluster of normal lymphocytes	Urinary tract infection, CLL, Lymphoma
	Aggregation ของ WBC ทุกชนิด	Alcoholic cirrhosis
	Nature and amount of anticoagulant	Sample contains excess of K3 EDTA
Spuriously High WBC Count	PLT aggregates and large PLTs	Myeloproliferative/ Myelodysplastic disorders
	Nucleated red blood cells (NRBC)	Physiological (newborns)
		Pathological (Thalassemia)
	Red blood cells resistant to lysis	Physiological (neonates)
		Pathological (Abnormal HbC, CC, CS)
		Liver disease, Uremia, chemotherapy
	Cryoglobulins	Cryoglobulinemia
Spuriously Elevated Hb	Lipids and hyperchylomicronemia	Severe/ acquired hypertryglyceridemia
	High WBC counts	WBC > 50 หรือ $100x10^9$/L
	Immunoglobulins	Multiple myeloma
	Hemolysis, Bilirubin>250-300 mg/L	Major intravascular hemolysis
		จาก chemical, mechanical hemolysis,
		hemolytic anamia
Spuriously Decreased Hb	Coagulation within the sample	
	Sulfhemoglobin	
Spuriously elevated RBC counts	High WBC count, Giant platelets	Anemia
Spuriously decreased RBC counts	Cold agglutinins	Cold agglutinins aggregate RBC
	Warm autoimmune hemolytic anemia	
	Very small RBC and discrimination	
	with PLT	
Possible interference	Intraerythrocytic particles: Howell-Jolly	Thalassemia, hemolytic anemia
Reticulocyte analysis	bodies, Pappenheimer bodies, basophilic	
	stippling, Heinz bodies etcs	

เอกสารอ้างอิง

1. *Felgar RE, Ryan DH. Automated analysis of blood cells. Hematology: Basic Principles and Practice 4th ed, 2005 Churchill Livingstone, Copyright 2008 Elsevier Inc.-www.mdconsult.com*
2. *Brugnara C, Hipp MJ, Irving PJ, Lathrop H, Lee PA, Minchello EM, Winkelman J. Automated reticulocyte counting and measurement of reticulocyte cellular indices evaluation of the Miles H*3 blood analyzer. Am J Clin Pathol 1994;102:623-32.*
3. *Butthep P, WisedpanichkijnR, Jindadamrongwech S, Kaewkethong P, Patthamakom S, Sila-Asna M, Bunyaratvej A. Reticulocyte analysis in iron deficiency anemia and hemolytic anemia. J Med Assoc Thai 2000;83(Suppl. 1):S114-22.*
4. *Gamperling N, Reinecke T. Hematopoietic progenitor cell (HPC) analysis: literature review. Sysmex J Int 2001;11:77-80.*
5. *Fernando C, Bethany T, Dongsheng X. Neutrophil volume distribution width: A new automated hematology parameter for acute infection. Arch Pathol Lab Med 2006;130:378-80.*
6. *Mohandas N, Kim YR, Tycko DH, Orlik J, Wyatt J, Groner W. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. Blood 1986;68:506-13.*
7. *Nagai Y, Kondo H, Tatsumi N. Validation of platelet counting accuracy hematology analyzer. J of Automated Method 2005;4: 235-39.*
8. *Igout J, Fretigny M, Vasse M et al. Evaluation of the coulter LH 750 haematology analyzer compared with flow cytometry as the reference method for WBC, platelet and nucleated RBC count. Clin Lab Haemat 2004;26:1-7.*
9. *Roberts GT, El Badawi SB. Red blood cell distribution width index in some hematologic diseases. Am J Clin Pathol 1984;83:222-6.*
10. *Theodorsen L. Haemoglobinometry and automated haematology analysers. Clin Lab Haematol 1987;9:377-85.*
11. *Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers :a review. Part I: platelets. Int Jnl Lab Hem 2007;29:4 -20.*
12. *Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers :a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. Int Jnl Lab Hem 2007;29:21-41.*