ผลกระทบต่อการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกจากตัวอย่างส่งตรวจที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง

The Effect of Hemolytic Contamination in Sample on Clinical Chemistry Analysis

ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ[1]*, วรภัทร บุญเยี่ยม[2], ธนวัฒน์ กษมาวุฒิ[3]
[1]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540
[2]สถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพมหานคร 10400
[3]ศิษย์เก่าคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

Panthip Rattanasinganchan[1]*, Worapat Boonyiam[2], Tanawat Kasamavut[3]
[1]Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn 10540
[2]Institute of Dermatology, Bangkok 10400
[3]Huachiew Chalermprakiet University Alumnus, Faculty of Medical Technology, Samutprakarn 10540
*Email : r_panthip@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลกระทบจากการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกในตัวอย่างส่งตรวจที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยใช้เลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดี 30 ราย ซึ่งอยู่ในช่วงอายุ 20-60 ปี เลือดครบส่วนจากอาสาสมัครถูกแยกออกมาเป็นพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงโดยวิธีการปั่นเหวี่ยง ส่วนเลือดที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงเตรียมโดยใส่เลือดแดงที่ทำให้แตกแล้ว ลงไปในพลาสมาของเจ้าของเลือด โดยคำนวณให้มีระดับฮีโมโกลบินเข้มข้นที่ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 3.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบได้กับตัวอย่างส่งตรวจที่มีระดับเม็ดเลือดแดงแตก 1+, 2+, 3+ และ 4+ ตามลำดับ หลังจากนั้น นำตัวอย่างทั้งหมดไปทำการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก 14 การทดสอบ ได้แก่ กลูโคส ยูเรียไนโตรเจน ครีอะตินีน กรดยูริค โคเลสเตอรอลรวม ไตรกลีเซอร์ไรด์ โคเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล โคเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล โปรตีนรวม อัลบูมิน บิลิรูบินรวม บิลิรูบินชนิดละลายน้ำ เอ็นไซม์แอสพาร์เทตอะมิโนทรานสเฟอเรส และเอ็นไซม์อะลานีน

อะมิโนทรานสเฟอเรส โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างส่งตรวจส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนี้ ภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดง 1+ ส่งผลต่อการวิเคราะห์ บิลิรูบินชนิดละลายน้ำได้ ($p<0.05$) ภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดง 2+ ส่งผลต่อการวิเคราะห์บิลิรูบินรวม และเอนไซมแอสพาร์เทตอะมิโนทรานสเฟอเรส ($p<0.05$) และภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดง 4+ ส่งผลต่อการวิเคราะห์กลูโคส กรดยูริค เอนไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส และโปรตีนรวม ($p<0.05$) อย่างไรก็ตาม การแตกของเม็ดเลือดแดงไม่ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการทดสอบ ยูเรียไนโตรเจน โคเลสเตอรอลรวม ไตรกลีเซอร์ไรด์ โคเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล โคเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล อัลบูมิน และ ครีอะตินีน ผลการวิจัยสรุปได้ว่า ระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงส่งผลกระทบต่อการทดสอบแตกต่างกันไป ดังนั้น ระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงเป็นปัจจัยสำคัญในการพิจารณาเพื่อป้องกันการปฏิเสธสิ่งส่งตรวจโดยไม่จำเป็น

คำสำคัญ : เคมีคลินิก การแตกของเม็ดเลือดแดง

Abstract

This study aimed to examine the effect of hemolysis by clinical chemistry analysis. Blood samples were obtained from 30 healthy volunteers in the age range of 20-60 years. Non-hemolyzed plasma was separated from whole blood by centrifugation. Hemolysis was simulated in samples by adding their own hemolysate to their non-hemolyzed plasma to make the final concentration of hemoglobin at 0.9 mg/mL, 1.8 mg/mL, 3.5 mg/mL and 6.7 mg/mL. These samples can be classified as 1+, 2+, 3+ and 4+ hemolysis samples respectively. Subsequently, all samples were analyzed for the following 14 parameters: glucose, BUN, creatinine, uric acid, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total protein, albumin, total bilirubin, direct bilirubin, AST and ALT using an automatic analyzer. Clinical chemistry analysis showed different hemolysis levels appear to increase the level of certain tests significantly. Accordingly, hemolysis 1+ affected direct bilirubin level ($p<0.05$). Hemolysis 2+ affected total bilirubin and AST level ($p<0.05$). Hemolysis 4+ affected glucose, uric acid, ALT and total protein level ($p<0.05$). However, hemolysis did not significantly affect to the results of BUN, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, albumin and creatinine level. In conclusion, these results suggest that different levels of hemolysis may affect different

chemical analytic parameters. Considering these results, hemolysis level may be an important factor to prevent unnecessary rejection.

Keywords : Clinical chemistry, Hemolysis

บทนำ

การทำงานทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 ก่อนการตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย การเก็บตัวอย่างส่งตรวจและการขนส่งตัวอย่างส่งตรวจ ขั้นตอนที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย การควบคุมคุณภาพ และการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ และขั้นตอนที่ 3 หลังการตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย การแปลผลการวิเคราะห์ รายงานผลการวิเคราะห์ การตรวจสอบการรายงานผลการวิเคราะห์ บันทึกผลการรักษา และการเก็บข้อมูล[1] การทำงานเหล่านี้สามารถเกิดความผิดพลาดได้ในทุก ๆ ขั้นตอน ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นอาจส่งผลต่อผู้ป่วย โดยทำให้ผู้ป่วยเสียเวลาสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ได้รับความล่าช้าในการรักษา และอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพและชีวิตของผู้ป่วยได้ เมื่อศึกษาถึงความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ ทางห้องปฏิบัติการ พบว่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่อยู่ในช่วงกระบวนการก่อนการตรวจวิเคราะห์[2] ปัญหาของกระบวนการก่อนการตรวจวิเคราะห์มีหลายสาเหตุ เช่น การปนเปื้อนตัวอย่างส่งตรวจจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ชื่อผู้ป่วยในใบส่งตรวจไม่ตรงกับหลอดเลือด ปริมาตรตัวอย่างส่งตรวจไม่ถูกต้อง และการใส่สารกันเลือดแข็งไม่เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์ เป็นต้น สิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ของผู้ป่วย จากสถิติพบว่าปัญหาที่พบมากที่สุด คือตัวอย่างส่งตรวจมีการปนเปื้อนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis sample) ปัจจุบันเกณฑ์ของสภาเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทยได้กำหนดความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ในพลาสมา (plasma) ที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงไว้ 4 ระดับ ดังนี้ ระดับการแตกของเม็ดเลือดแดง 1+ จะมี ฮีโมโกลบิน 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับการแตกของเม็ดเลือดแดง 2+ จะมีฮีโมโกลบิน 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับการแตกของเม็ดเลือดแดง 3+ จะมีฮีโมโกลบิน 3.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และระดับการแตกของเม็ดเลือดแดง 4+ จะมี ฮีโมโกลบิน 6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การแตกของเม็ดเลือดแดงแต่ละระดับนั้นอาจทำให้ค่าการตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ ทางเคมีคลินิกมีค่าสูงหรือต่ำกว่าความเป็นจริงได้ เนื่องจากในเม็ดเลือดแดงมีองค์ประกอบของสารบางชนิดที่เหมือนกับในพลาสมา แต่อาจมีความเข้มข้นต่างกัน นอกจากนี้ ฮีโมโกลบินและสารบางชนิดในเม็ดเลือดแดงอาจรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกได้อีกด้วย ดังนั้น หากทราบถึงผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกจากตัวอย่างส่งตรวจที่มีระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงตามที่ใช้อ้างอิงตามสภาเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย จะเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณารับหรือปฏิเสธตัวอย่างส่งตรวจและช่วยเพิ่มความระมัดระวังในการรายงานผลผู้ป่วยอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลกระทบของระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างส่งตรวจต่อผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ ศึกษาในอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีจำนวน 30 ราย โดยตรวจสอบสุขภาพจากประวัติและผลการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกก่อนทำการทดสอบ การวิจัยครั้งนี้ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมงานวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรม มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ (เลขที่รับรอง อ.574/2559.)

1. กลุ่มตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างส่งตรวจ อาสาสมัครที่มาเจาะเลือดเป็นผู้มีสุขภาพดีและอดอาหารเป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง เจาะเลือดที่เส้นเลือดดำที่บริเวณข้อพับด้านหน้า ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดเฮพาริน (heparin)

2. การเตรียมตัวอย่างส่งตรวจให้มีการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับ 1+ ถึง 4+

2.1 อาสาสมัครแต่ละคนจะถูกแบ่งเลือดที่เจาะมาได้ 20 มิลลิลิตร เป็นสองส่วน ส่วนแรก ปริมาตร 18 มิลลิลิตร มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกชั้นพลาสมา ส่วนที่สอง 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินและนำไปเตรียมให้ได้ตัวอย่างตรวจที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ระดับ 1+ ถึง 4+

2.2 นำเลือดครบส่วน (whole blood) ในส่วนที่สอง ไปแช่แข็งที่ 0 องศา เป็นเวลา 30 นาที และวัดระดับฮีโมโกลบิน ด้วยเครื่อง Sysmex Automated XT-1800i, Sysmex USA [3]

2.3 คำนวณความเข้มข้นฮีโมโกลบินที่แตกอยู่ในพลาสมา (hemolysate) และเติมลงไปในพลาสมาให้มีความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่ 1+ ถึง 4+ (0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 3.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามเกณฑ์ของสภาเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย และนำไปวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินอีกครั้งด้วยเครื่องวิเคราะห์ระดับฮีโมโกลบิน

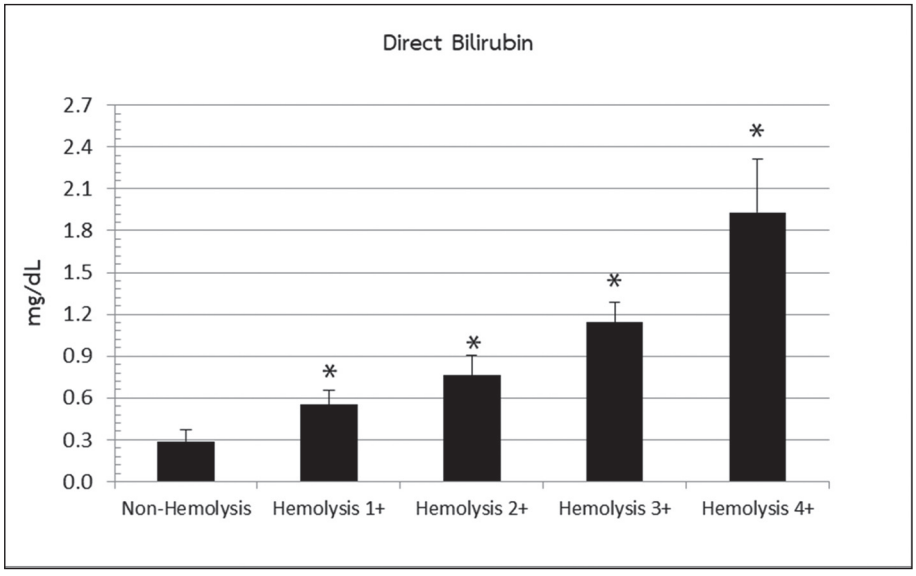
3. การตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิก นำตัวอย่างส่งตรวจที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงทั้ง 4 ระดับ และตัวอย่างส่งตรวจที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง มาทำการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก โดยใช้เครื่อง Rayto-200c chemistry analyzer (MA, USA) เพื่อตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในพลาสมาทั้งหมด 14 รายการทดสอบ โดยมีการทดสอบและหลักการวิเคราะห์ดังนี้ กลูโคส (glucose) ทดสอบโดย enzymatic colorimetric assay ยูเรีย (urea) ทดสอบโดย UV-kinetic assay ครีอะตินิน (creatinine) ทดสอบโดย Jaffe-alkaline picrate assay กรดยูริค (uric acid) ทดสอบโดย Modified Trinder-

uricase/PAP assay โคเลสเตอรอลรวม (total cholesterol) ทดสอบโดย enzymatic colorimetric assay ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ทดสอบโดย enzymatic colorimetric assay โคเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล (HDL-cholesterol) ทดสอบโดย enzymatic colorimetric assay โคเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล (LDL-cholesterol) ทดสอบโดย enzymatic colorimetric assay อัลบูมิน (albumin) ทดสอบโดย BCG assay โปรตีนรวม (total protein) ทดสอบโดย Biuret assay บิลิรูบินชนิดละลายน้ำ (direct bilirubin) ทดสอบโดย colorimetric assay บิลิรูบินรวม (total bilirubin) ทดสอบโดย colorimetric assay เอ็นไซม์แอสพาร์เทตอะมิโนทรานสเฟอเรส (aspartate aminotransferase; AST) ทดสอบโดย kinetic assay และเอนไซม์ อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส (alanine aminotransferase; ALT) ทดสอบโดย kinetic assay โดยทำการทดสอบค่า control ทั้งสองระดับ คือ control normal level และ control high level (EUROCONTROL N 0418 LOT3580, EUROCONTROL P 0518 LOT5570 ตามลำดับ) ก่อนวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ

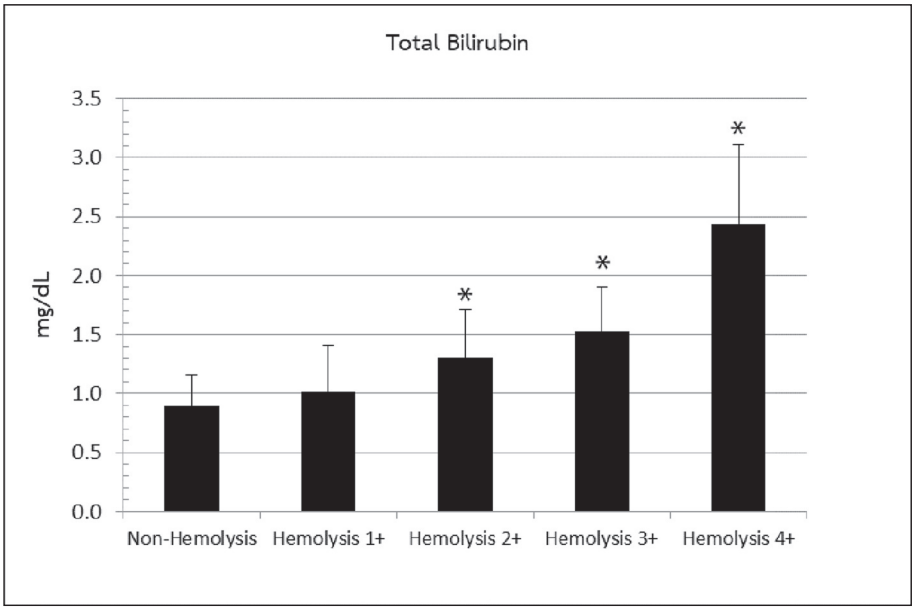
สถิติที่ใช้ในการวิจัย วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงในระดับต่าง ๆ เทียบกับพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยใช้ one-way ANOVA โปรแกรม SPSS version 17, *p-value <0.05*

ผลการวิจัย

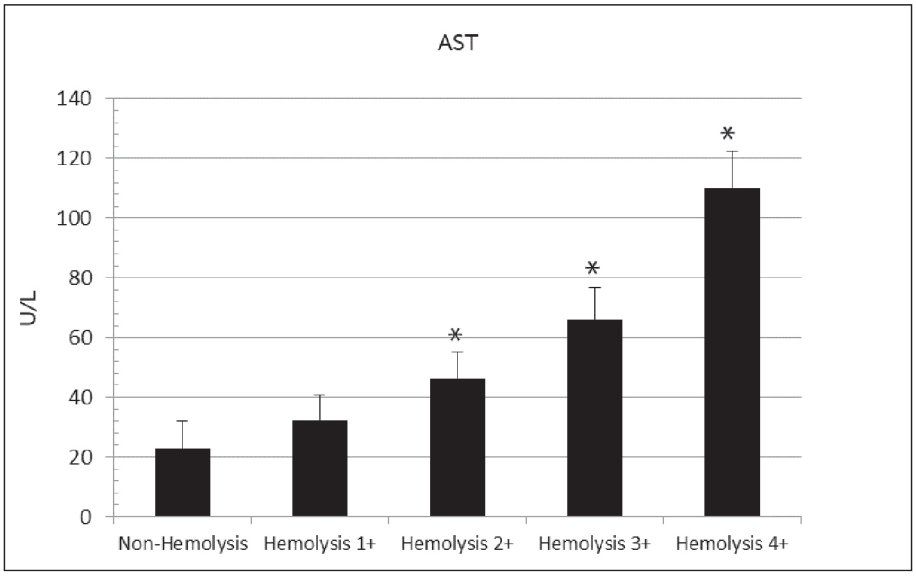
การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ผลการวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกทั้ง 14 รายการ โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างส่งตรวจพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง และพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง ที่ระดับ 1+ถึง 4+ (ตารางที่ 1) พบว่า การแตกของเม็ดเลือดตั้งแต่ระดับ 1+ มีผลกระทบต่อค่าของบิลิรูบินชนิดละลายน้ำได้ โดยค่าที่ได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p<0.05*) (รูปที่ 1) ขณะที่พลาสมาที่มีการแตกของเม็ดแดงระดับ 2+ จะเริ่มส่งผลผลต่อค่าบิลิรูบินรวมและเอ็นไซม์แอสพาร์เทตอะมิโนทรานสเฟอเรส โดยมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p<0.05*) (รูปที่ 2 และ 3) แต่ระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ระดับ 3+ ไม่พบการทดสอบที่ให้ผลแตกต่างไปจากการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับ 2+ และการแตกของเม็ดแดงที่ระดับ 4+ พบว่า กลูโคส กรดยูริค โปรตีนรวม และเอนไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p<0.05*) (รูปที่ 4, 5, 6 และ 7) ส่วนค่ายูเรียไนโตรเจน ครีอะตินิน ไตรกลีเซอไรด์ โคเลสเตอรอลรวม อัลบูมิน โคเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล และโคเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล พบว่าการแตกของเม็ดเลือดที่ระดับต่าง ๆ ไม่ส่งผลอย่างมีนัยทางสถิติต่อการวิเคราะห์สารเหล่านี้ (*p>0.05*)



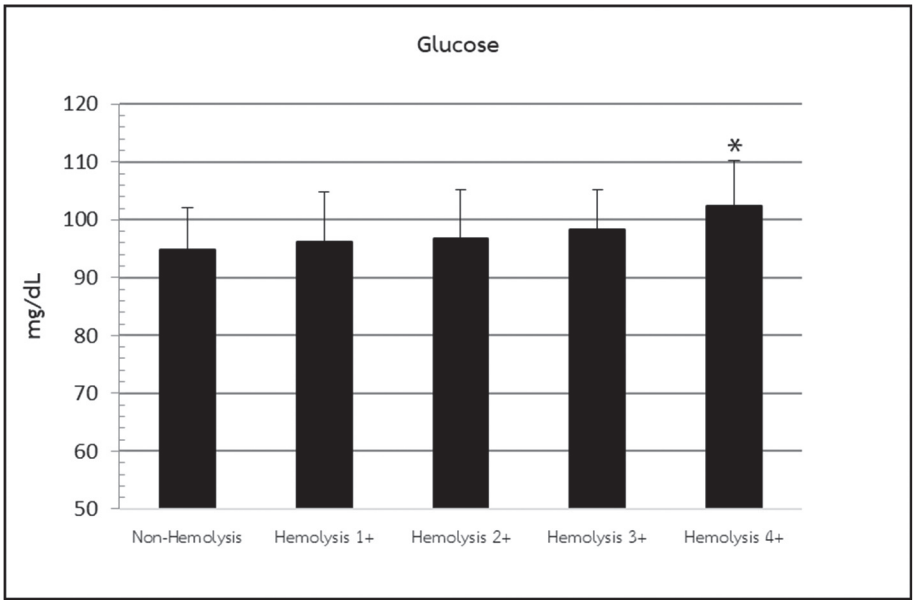
รูปที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณบิลิรูบินชนิดละลายน้ำในพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อเริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดตั้งแต่ที่ระดับ 1+ ระดับบิลิรูบินที่ละลายน้ำได้เริ่มมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $p< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง)



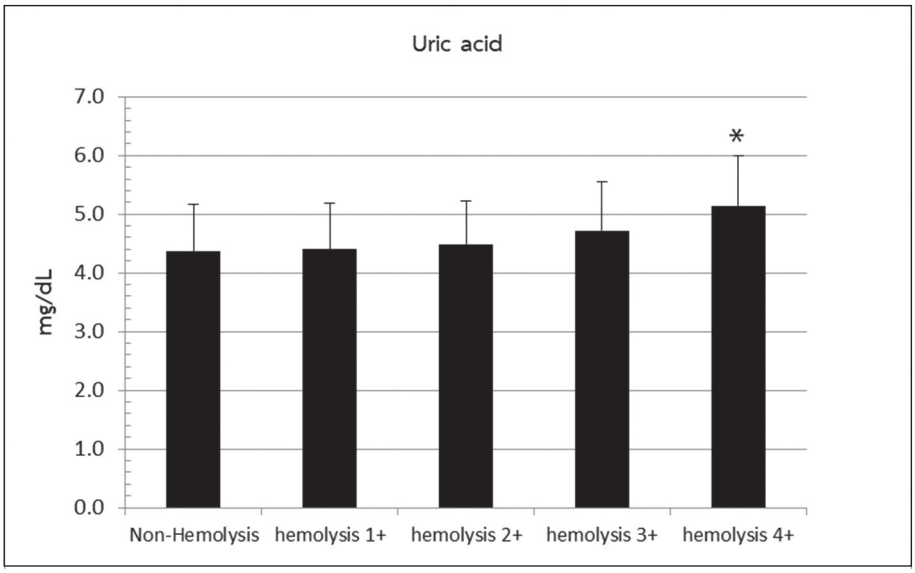
รูปที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณบิลิรูบินรวมในพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อเริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดตั้งแต่ที่ระดับ 2+ ระดับบิลิรูบินรวม มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $p< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง)



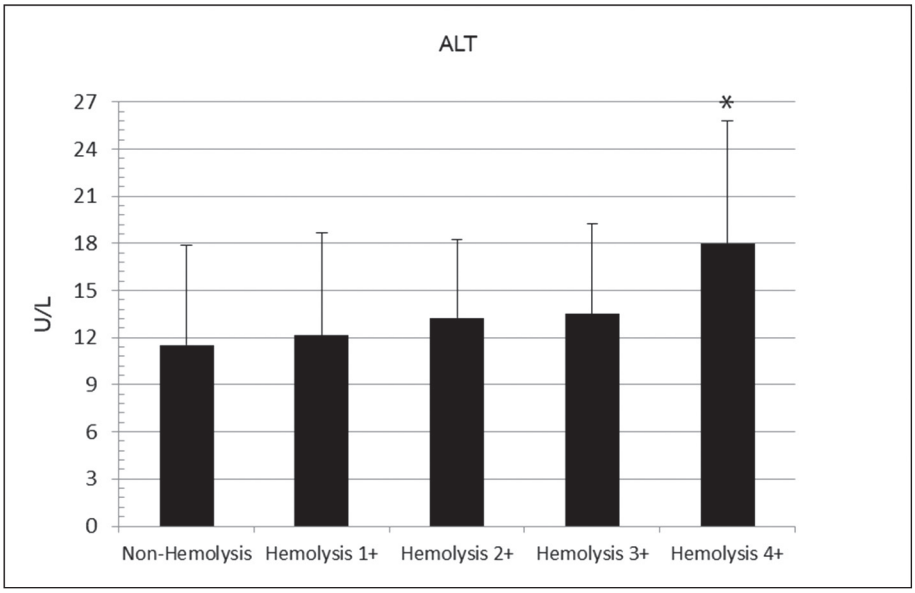
รูปที่ 3 การวิเคราะห์การทำงานของเอ็นไซม์แอสพาร์เทตอะมิโนทรานสเฟอเรสในพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อเริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดตั้งแต่ที่ระดับ 2+ ระดับเอ็นไซม์แอสพาร์เทต อะมิโนทรานสเฟอเรสมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $p< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง)



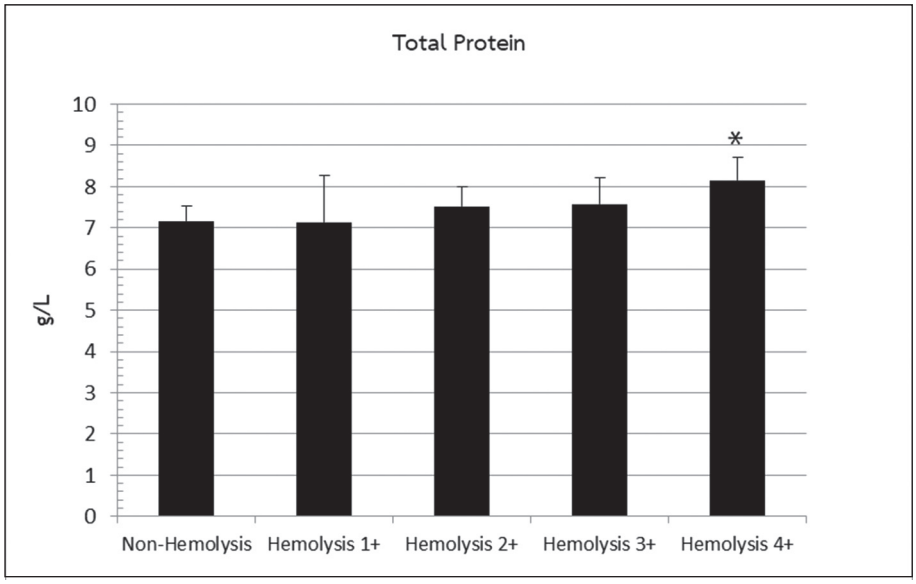
รูปที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อเริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดตั้งแต่ที่ระดับ 4+ ระดับกลูโคสมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $p< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง)



รูปที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดยูริคในพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดตั้งแต่ที่ระดับ 4+ ระดับกรดยูริคมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* *p< 0.05* เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง)



รูปที่ 6 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรสในพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อเริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดตั้งแต่ที่ระดับ 4+ ระดับเอนไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* *p< 0.05* เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง)



รูปที่ 7 การวิเคราะห์โปรตีนรวมในพลาสมาที่มีระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อเริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดที่ระดับ 4+ ระดับโปรตีนรวมมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $p< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกในพลาสมาที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงระดับต่าง ๆ

การทดสอบ	Unit		Non-hemolysis	Hemolysis 1+	Hemolysis 2+	Hemolysis 3+	Hemolysis 4+
บิลิรูบินชนิดละลายน้ำได้	mg/dL	mean±SD	0.29±0.08	0.55±0.11	0.76±0.14	1.14±0.15	1.93±0.38
		p-value		0	0	0	0
เอนไซม์แอสปาเตท อะมิโน ทรานเฟอร์เรส	U/L	mean±SD	23±9.1	32±8.3	46±8.9	66±10.6	110±12.4
		p-value		0.3	0	0	0
บิลิรูบินรวม	mg/dL	mean±SD	0.89±0.3	1.02±0.4	1.30±0.4	1.52±0.4	2.43±0.7
		p-value		0.824	0.005	0	0
กลูโคส	mg/dL	mean±SD	95±7.4	96±8.7	97±8.4	98±6.8	102±8
		p-value		0.963	0.732	0.468	0.032
กรดยูริค	mg/dL	mean±SD	4.4±0.8	4.4±0.8	4.5±0.7	4.7±0.8	5.1±0.8
		p-value		1	0.974	0.427	0.002
อะลานีนอะมิโน ทรานสเฟอเรส	U/L	mean±SD	12±6.4	12±6.5	13±5.0	14±5.8	18±7.8
		p-value		0.996	0.843	0.767	0.002
โปรตีนรวม	g/dL	mean±SD	7.2±0.4	7.1±1.1	7.5±0.5	7.6±0.6	8.2±0.6
		p-value		1	0.212	0.094	0

การทดสอบ	Unit		Non-hemolysis	Hemolysis 1+	Hemolysis 2+	Hemolysis 3+	Hemolysis 4+
ยูเรียไนโตรเจน	mg/dL	mean±SD	11.6±2.5	11.7±2.5	11.9±2.6	12.1±2.5	11.9±2.5
		p-value		1	0.983	0.906	0.962
ครีอะตินิน	mg/dL	mean±SD	1.0±0.1	0.9±0.3	0.9±0.2	0.9±0.3	0.9±0.3
		p-value		0.981	0.803	0.805	0.97
ไตรกลีเซอไรด์	mg/dL	mean±SD	82.2±30.3	87.0±39.7	87.3±38.1	84.1±32.1	93±36.0
		p-value		0.99	1	1	0.78
โคเลสเตอรอลรวม	mg/dL	mean±SD	181.8±12.1	179.1±39.4	185.7±46	197.2±31	206.5±30.1
		p-value		1	1	0.97	0.54
อัลบูมิน	g/dL	mean±SD	3.5±0.3	3.4±0.4	3.5±0.4	3.5±0.5	3.8±0.4
		p-value		1	0.999	0.995	0.44
โคเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล	mg/dL	mean±SD	60±11	61±13	62±14	68±34	69±18
		p-value		1	0.999	0.615	0.465
โคเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล	mg/dL	mean±SD	103±20.2	102±26.8	99.4	96.1	99.2±21.1
		p-value		1	0.978	0.806	0.972

อภิปรายผลการวิจัย

การแตกของเม็ดเลือดแดงอาจส่งผลได้ทั้งการเพิ่มขึ้นและการลดลงของสารที่ตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก เนื่องจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันระหว่างสารที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและในพลาสมา นอกจากนี้ผลกระทบจากฮีโมโกลบินที่มีการดูดกลืนแสงในช่วงประมาณ 417 540 และ 575 นาโนเมตร ซึ่งอาจส่งผลรบกวนการวิเคราะห์ที่มีช่วงการดูดกลืนแสงของสารที่ทำการวิเคราะห์ใกล้เคียงกัน

การวิจัยในครั้งนี้พบว่า การวิเคราะห์สารที่มีความไวต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง ได้แก่ บิลิรูบินชนิดละลายน้ำได้ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในภาวะที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงในพลาสมาที่ 1+ (0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งการวิเคราะห์บิลิรูบินชนิดละลายน้ำได้นี้ ใช้หลักการ colorimetric assay โดยวิเคราะห์สารอะโซบิลิรูบิน (azo bilirubin) ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินที่ 540 นาโนเมตร ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้มีค่าสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบบิลิรูบินรวม ที่ใช้ความยาวคลื่นในการวิเคราะห์เดียวกับบิลิรูบินชนิดละลายน้ำ โดยพบว่าระดับบิลิรูบินรวมมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดแดงในพลาสมาที่ 1+ และมีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ระดับ 2+ (1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) การทดลองในครั้งนี้ ต่างจากการทดลองของ Frank et al[4] ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้หลักการของ Jendrassik and Grof พบว่า การแตกของเม็ดเลือดแดง (0.09-2.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของบิลิรูบินรวม แต่ Koseoglu et al[5] พบว่า ระดับบิลิรูบินรวมที่วิเคราะห์โดยใช้หลักการ colorimetric assay มีระดับต่ำลงกว่าภาวะที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงถึงร้อยละ 100 ที่ฮีโมโกลบิน 3.34 กรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดจากซูโดเพอร์ออกซิเดส (pseudoperoxidase) ในเม็ดเลือดแดงไปยับยั้งการเกิดสีของไดอะโซเนียม (diazonium) ในปฏิกริยาการวิเคราะห์

เอนไซม์แอสปาเตทอะมิโนทรานเฟอร์เรสมีความเข้มข้นในเม็ดเลือดแดงมากกว่าในพลาสมา การแตกของเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างส่งตรวจจึงเป็นสิ่งที่ควรระวังในการรายงานผลทางห้องปฏิบัติการ จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่า เอนไซม์นี้มีค่าสูงขึ้นเมื่อเริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดแดงและเริ่มมีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ฮีโมโกลบิน 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ 2+ ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ของ Frank et al[4] ที่พบว่าเอนไซม์แอสปาเตทอะมิโนทรานเฟอร์เรส มีค่าสูงขึ้นตั้งแต่เริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดแดงและสูงขึ้นถึง 69-84% ที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ 4+ (2.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ Koseoglu et al[5] ทดสอบภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยพบว่า ในกลุ่มที่ 5 severely hemolyzed มีค่าฮีโมโกลบิน 2.51-4.5 กรัมต่อลิตร ค่าเอนไซม์แอสปาเตทอะมิโนทรานเฟอร์เรสจะเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ Yucel and Dalva[6] ที่ทดสอบภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยใช้แท่งปั่นแม่เหล็กปั่น โดยแบ่งออกได้เป็นสามกลุ่มโดยมีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินดังนี้ กลุ่มที่ I 0.744±0.496 ไมโครโมลต่อลิตร กลุ่มที่ II 6.743 ±2.155 ไมโครโมลต่อลิตร กลุ่มที่ III 17.608±4.247 ไมโครโมลต่อลิตร แต่พบว่า เอนไซม์แอสปาเตทอะมิโนทรานเฟอเรส มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบหน่วยความเข้มเดียวกับการทดสอบครั้งนี้แล้วพบว่าความเข้มข้นของกลุ่มที่ III มีค่าประมาณ 1.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงไม่ถึง 2+ (1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยในครั้งนี้

การแตกของเม็ดเลือดแดงที่ระดับ 4+ พบว่า การทดสอบที่เริ่มมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้แก่ เอ็นไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส กลูโคส กรดยูริค และโปรตีนรวม ผลที่ได้สอดคล้องกับ Koseoglu et al[5] ที่พบว่า ระดับเอ็นไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรสสูงขึ้นถึง 1.2 เท่า ในพลาสมาที่มีฮีโมโกลบิน 4.5 กรัมต่อลิตร การวิจัยในครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์กลูโคสและยูริคโดยใช้หลักการ colorimetric และวิเคราะห์โดยใช้ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ซึ่งปริมาณฮีโมโกลบิน ที่ระดับ 6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อทั้งสองการทดสอบนี้ ซึ่งต่างจาก Koseoglu et al[5] ที่พบว่า ทั้งกลูโคสและกรดยูริคมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อวิเคราะห์โดยใช้หลักการ hexokinase และ uricase ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ต่างเทคนิค การวิจัยในครั้งนี้ใช้วิเคราะห์โดยเทียบสีจึงอาจทำให้การแตกของเม็ดเลือดแดงส่งผลต่อการวิเคราะห์มากกว่าการใช้หลักการของเอนไซม์ในการวิเคราะห์

งานวิจัยครั้งนี้ พบว่า การแตกของเม็ดเลือดแดง (0.9 - 6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการทดสอบดังต่อไปนี้ ยูเรียไนโตรเจน โคเลสเตอรอลรวม ไตรกลีเซอร์ไรด์

โคเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล โคเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล อัลบูมิน และครีอะตินีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Yucel and Dalva[6] โดยพบว่า ค่าที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับฮีโมโกลบิน 0.774-4.247 ไมโครโมลต่อลิตร ได้แก่ ยูเรียไนโตรเจน ไตรกลีเซอร์ไรด์ ครีอะตีนีน และอัลบูมิน และงานวิจัยของ Frank et al[4] พบว่า ค่าที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ฮีโมโกลบิน 0.09-2.800 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ แคลเซียม (calcium) ฟอสเฟต (phosphate) ยูเรีย กรดยูริค อัลบูมิน เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) โคเลสเตอรอลรวม โปรตีนรวม และบิลิรูบินรวม

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่า ระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงส่งผลแตกต่างกันไปในแต่ละการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยการวิเคราะห์ที่พบการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ 1+ ถึง 2+ (0.9-1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้แก่ บิลิรูบินชนิดละลายน้ำ บิลิรูบินรวม และเอนไซม์แอสปาเตสอะมิโนทรานเฟอร์เรส และเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดแดงสูงสุดของเกณฑ์สภาเทคนิคการแพทย์ไทย คือ ที่ระดับการแตกของเม็ดเลือดแดง 4+ (6.7 มิลิกรัมต่อมิลลิลิตร) พบการเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส กลูโคส กรดยูริค และโปรตีนรวม แต่อย่างไรก็ตาม การแตกของเม็ดเลือดแดงสูงสุดถึงระดับ 4+ ไม่ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อ ยูเรียไนโตรเจน โคเลสเตอรอลรวม ไตรกลีเซอร์ไรด์ โคเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล โคเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล อัลบูมิน และครีอะตินีน จากการวิจัยสรุปได้ว่า ผลกระทบจากการแตกของเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างส่งตรวจขึ้นกับระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงและหลักการวิเคราะห์ ดังนั้น การทราบระดับการแตกของเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างส่งตรวจ และ หลักการวิเคราะห์ของตัวอย่างส่งตรวจ จะช่วยในการประเมินการรับหรือปฏิเสธตัวอย่างส่งตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น การลดปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างส่งตรวจ เช่น เพิ่มความระวังในการเจาะเลือด โดยเลือกเข็มที่เหมาะสมกับเส้นเลือด และขนส่งตัวอย่างส่งตรวจด้วยความระมัดระวัง จะทำให้ผลทางห้องปฏิบัติการมีความถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การแตกของเม็ดเลือดแดงในบางกรณี อาจเกิดจากปัญหาสุขภาพของผู้ป่วยเอง ดังนั้น บางครั้งการตรวจวิเคราะห์อาจไม่สามารถหลีกเลี่ยงตัวอย่างส่งตรวจที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ จึงจำเป็นต้องเลือกใช้หลักการทดสอบที่ไม่ถูกรบกวนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง หรือเพิ่มการตัดสีของตัวอย่างส่งตรวจ (sample blank) ในกรณีที่สารที่วิเคราะห์มีการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับฮีโมโกลบิน เพื่อให้ได้ค่าการวิเคราะห์ที่ถูกต้องที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัทอะตอมมิคซายน์ดิสทริบิวท์ จำกัด ประเทศไทย ที่สนับสนุนเครื่องอัตโนมัติ Rayto-200c chemistry analyzer และน้ำยาบางส่วนที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Wooley A, Golmard L, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyzer. Int J lab hematol. 2016;38(4):375-88.

2. Green SF. The cost of poor blood specimen quality and errors in preanalytical processes. Clin Biochem. 2013;46:1175-9.

3. Sysmex-europe.com [Internet]. SLS detection method [cited 2016 Oct 30]. Available from: http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/sls-detection-method.html

4. Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of *in vitro* hemolysis on chemical values for serum. Clin Chem. 1978;24(11):1966-70.

5. Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. Effects of hemolysis interference on routine biochemistry parameters. Biochemia Medica. 2011;21(1):79-85.

6. Yucel D, Dalva K. Effect of *in vitro* hemolysis on 25 common biochemical tests. Clin Chem. 1992;38(4);575-7.