

นิพนธ์ต้นฉบับ

ความคงตัวของเรติคูลโลไซต์ในตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมง

ลัดดาวัลย์ มนัสธีรภาพ กันตา เดิมสังข์ นวลตา นคราบัณฑิตย์ และ ชวดี นพรัตน์

หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ การประเมินการทำงานของไขกระดูกในการสร้างเม็ดเลือดแดงทำได้โดยดูจากจำนวนเรติคูลโลไซต์ในกระแสเลือด วิธีมาตรฐานในการตรวจนับเรติคูลโลไซต์คือย้อมด้วย 0.5% new methylene blue และนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาเรื่องอุณหภูมิและเวลาที่จะสามารถจัดเก็บตัวอย่างเลือดไว้เพื่อทำการตรวจนับเรติคูลโลไซต์ได้ **วัตถุประสงค์** เพื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์ในตัวอย่างเลือดสดกับตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C และ 4°C ในระยะเวลา 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง **วิธีการศึกษา** ใช้ตัวอย่างเลือด 158 ตัวอย่าง มีช่วงค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์ ตั้งแต่ 0.2-32.9 ตรวจนับเรติคูลโลไซต์ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ดังกล่าว **ผลการศึกษา** ค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเก็บเลือดที่อุณหภูมิ 25°C ถึงระยะเวลา 8 ชั่วโมง ($p = 0.57$, $r = 0.99$) ส่วนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ได้ถึง 24 ชั่วโมง ($p = 0.20$, $r = 0.99$) โดยสเมียร์ยังมีคุณภาพร้อยละ 100 **สรุป** ความคงตัวของเรติคูลโลไซต์ในตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ 25°C และ 4°C อยู่ได้นาน 8 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ โดยคุณภาพของสเมียร์ยังสมบูรณ์อยู่

Keywords : ● การนับจำนวนเรติคูลโลไซต์ ● เวลา ● อุณหภูมิ ● เมธิลีนบลู

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2557;24:269-76.

บทนำ

เรติคูลโลไซต์ (reticulocyte) คือเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนระยะสุดท้ายที่ไม่มีนิวเคลียส (nucleus) แต่ยังคงมีกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) อยู่ในไซโตพลาสซึม RNA จะมีมากในเรติคูลโลไซต์ตัวอ่อนและลดปริมาณลงเมื่อเซลล์แก่ขึ้น จำนวนเรติคูลโลไซต์ที่ตรวจพบในกระแสเลือด บ่งชี้ประสิทธิภาพการสร้างเม็ดเลือดแดงของไขกระดูก จึงใช้ประกอบการวินิจฉัยและติดตามการรักษาภาวะโลหิตจางได้¹⁻⁸

เนื่องจาก RNA ในเรติคูลโลไซต์ถูกย้อมด้วยสีที่มีคุณสมบัติย้อมเซลล์ขณะที่มีชีวิต (supravital stain) เห็นเป็นตะกอน (granule) หรือร่างแห (reticulum) สถาบัน CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) จึงได้กำหนดวิธีมาตรฐานโดยการย้อมเรติคูลโลไซต์ด้วย new methylene blue และนับเรติคูลโลไซต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อเม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์คำนวณเป็นร้อยละ ในการตรวจนับเรติคูลโลไซต์ในกระแสเลือดวิธีนี้มีข้อจำกัดคือต้องใช้เลือดสด (fresh blood) ที่เจาะเก็บไม่เกิน

2 ชั่วโมงจึงจะให้ค่าที่ถูกต้องและแม่นยำ⁴ แต่ในการปฏิบัติงานประจำทางห้องปฏิบัติการมักพบปัญหาแพทย์ส่งเพิ่มการตรวจเรติคูลโลไซต์หลังทราบผลการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count, CBC) โดยขอใช้ตัวอย่างเลือดเดิมซึ่งยังไม่มีการศึกษายืนยันว่าเรติคูลโลไซต์ยังคงตัวอยู่หรือไม่ รวมทั้งไม่มีข้อมูลของอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับเก็บตัวอย่างเลือดไว้ทำการทดสอบจำนวนเรติคูลโลไซต์

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าเรติคูลโลไซต์จะหมุนเวียนอยู่ในกระแสเลือดได้นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ก่อนจะกลายเป็นเม็ดเลือดแดงตัวแก่² และมีข้อมูลสนับสนุนว่าค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์จะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญใน 24 ชั่วโมงแรก ด้วยวิธีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์^{4,9} คณะผู้วิจัยจึงศึกษาเปรียบเทียบผลจากการเก็บตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ กันเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่างเลือดสดตามข้อกำหนดของวิธีมาตรฐาน โดยการประเมินจากคุณภาพของสเมียร์และจำนวนร้อยละของเรติคูลโลไซต์

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างการศึกษา

ใช้เลือดเจาะจากหลอดเลือดดำ ผสมสาร K₂EDTA (dipotassium ethylene diamine tetraacetate) เป็นสารกันเลือดแข็งตัว ปริมาตร

ได้รับต้นฉบับ 5 มิถุนายน 2557 รับลงตีพิมพ์ 6 สิงหาคม 2557

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ ลัดดาวัลย์ มนัสธีรภาพ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

2 มิลลิลิตร จำนวน 158 ตัวอย่าง มีช่วงค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์ เท่ากับ 0.2 ถึง 32.9 โดยนำตัวอย่างเลือดสดเจาะเก็บไม่เกิน 2 ชั่วโมง (ตัวอย่างเลือด A) ในแต่ละรายมาทำการตรวจนับร้อยละของเรติคูลโลไซต์เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบ (วิธี A) จากนั้นแบ่งตัวอย่างเลือดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิ 25°C (ตัวอย่างเลือด B) ส่วนที่ 2 เก็บที่อุณหภูมิ 4°C (ตัวอย่างเลือด C) แล้วนำตัวอย่างเลือด B และ C ทำการตรวจนับร้อยละของเรติคูลโลไซต์ ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง (วิธี B₁ และ C₁) 24 ชั่วโมง (วิธี B₂ และ C₂) 48 ชั่วโมง (วิธี B₃ และ C₃) และ 72 ชั่วโมง (วิธี B₄ และ C₄) ตามลำดับ

การย้อมเรติคูลโลไซต์

ใช้เลือด 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.5% new methylene blue (ซึ่งสี new methylene blue, Fluka, U.S.A. 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองและเก็บในขวดสีฟ้าที่อุณหภูมิห้อง) 50 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 12 x 75 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากัน อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที^{10,11} จากนั้นนำส่วนผสมทำสเมียร์แห้ง 1 แผ่น ในแต่ละเวลาของตัวอย่างเลือด

การตรวจนับเรติคูลโลไซต์

ผู้ตรวจนับ ใช้ผู้ตรวจนับ 3 คน ที่ผ่านการประเมินประสิทธิภาพการตรวจนับเรติคูลโลไซต์มาก่อนแล้วว่าสามารถนับได้ถูกต้อง และค่าผลการตรวจนับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05¹⁰

วิธีการตรวจนับ นำสเมียร์แห้งที่กำหนดหมายเลขแบบสุ่มเพื่อป้องกันการลำเอียงมาตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนับเซลล์เรติคูลโลไซต์บริเวณที่มีการกระจายของเซลล์เรติคูลโลไซต์ต่อเม็ดเลือดแดงสม่ำเสมอ และนับเซลล์ที่มีตะกอนหรือว่างแหว่สีน้ำเงินตั้งแต่ 2 จุดขึ้นไปในเม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ แล้วคำนวณค่าเป็นร้อยละ^{4,12,13}

การประเมินคุณภาพสเมียร์เรติคูลโลไซต์

ทำการประเมินคุณภาพสเมียร์เรติคูลโลไซต์ทุกระยะการจับเปรียบเทียบกับสเมียร์เรติคูลโลไซต์จากเลือดสดในหัวข้อต่อไปนี้เป็นคือ

การติดสี โดยระบุว่ามีการติดสีข้างลงเมื่อพบว่าภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เรติคูลโลไซต์ติดสีฟ้าจางจนไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ชัดเจน

ความคมชัดของเซลล์ โดยระบุว่าไม่คมชัดเมื่อไม่สามารถระบุตะกอนเรติคูลัม (reticulum) ในเซลล์เรติคูลโลไซต์ได้

ลักษณะของเซลล์ โดยระบุลักษณะเซลล์เรติคูลโลไซต์เดี่ยวเมื่อพบลักษณะหนามรอบเซลล์ ระบุลักษณะเซลล์เรติคูลโลไซต์แตกเมื่อพบเฉพาะตะกอนเรติคูลัมโดยไม่เห็นขอบเขตของเซลล์เรติคูลโลไซต์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ คำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของเรติคูลโลไซต์ ระหว่างตัวอย่างเลือดสดเจาะเก็บไม่เกิน 2 ชั่วโมง กับตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ที่ระยะเวลา 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยวิธี paired t- test ทดสอบความสัมพันธ์ทางสถิติโดยวิธี Pearson's correlation และหาค่า p value เปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของแต่ละตัวอย่างด้วย Bland Altman plot

ผลการศึกษา

การประเมินคุณภาพสเมียร์เรติคูลโลไซต์

ผลการประเมินคุณภาพของสเมียร์ จำนวน 158 ตัวอย่าง ด้วยวิธีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดสด (Table 1)

ตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง เซลล์เรติคูลโลไซต์ คุณภาพการติดสีปกติ ตะกอนเรติคูลัมคมชัด ลักษณะเซลล์ปกติใกล้เคียงกับเลือดสด (Figure 1a) ร้อยละ 100 แต่เมื่อเก็บถึงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์เรติคูลโลไซต์ คุณภาพการติดสีจางลง ตะกอนเรติคูลัมไม่คมชัด ลักษณะเซลล์ปกติ ร้อยละ 88.61 และเซลล์เรติคูลโลไซต์เดี่ยวร้อยละ 11.39 และตัวอย่างที่เก็บที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์เรติคูลโลไซต์ คุณภาพการติดสีจางลง ตะกอนเรติคูลัมไม่คมชัด ลักษณะเซลล์ปกติ ร้อยละ 16.46 เซลล์เรติคูลโลไซต์เดี่ยวและแตกเหลือเฉพาะเรติคูลัมร้อยละ 83.54 และเมื่อเก็บจนถึงที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์เรติคูลโลไซต์ คุณภาพการติดสีจางลง ตะกอนเรติคูลัมไม่คมชัด เซลล์เรติคูลโลไซต์เดี่ยว แตกเหลือเฉพาะเรติคูลัม และเศษเม็ดเลือดแดงร้อยละ 100 (Figure 1 b-e)

ส่วนตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ที่ระยะเวลา 8 และ 24 ชั่วโมง เซลล์เรติคูลโลไซต์ คุณภาพการติดสีปกติ ตะกอนเรติคูลัมคมชัด ลักษณะเซลล์ปกติใกล้เคียงกับเลือดสดร้อยละ 100 แต่เมื่อเก็บถึงที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์เรติคูลโลไซต์ คุณภาพของการติดสีจางลง ตะกอนเรติคูลัมไม่คมชัด ลักษณะเซลล์ปกติร้อยละ 89.24 เซลล์เรติคูลโลไซต์เดี่ยวร้อยละ 10.76 และเมื่อเก็บจนถึงที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์เรติคูลโลไซต์ คุณภาพ

Table 1 Storage temperature and time effected on the quality of reticulocyte smear

Storage temperature (°C) \ Storage time (hr)	The percentage of qualified reticulocyte staining				
	2	8	24	48	72
25	100	100	88.61	16.46	0
4	-	100	100	89.24	16.46

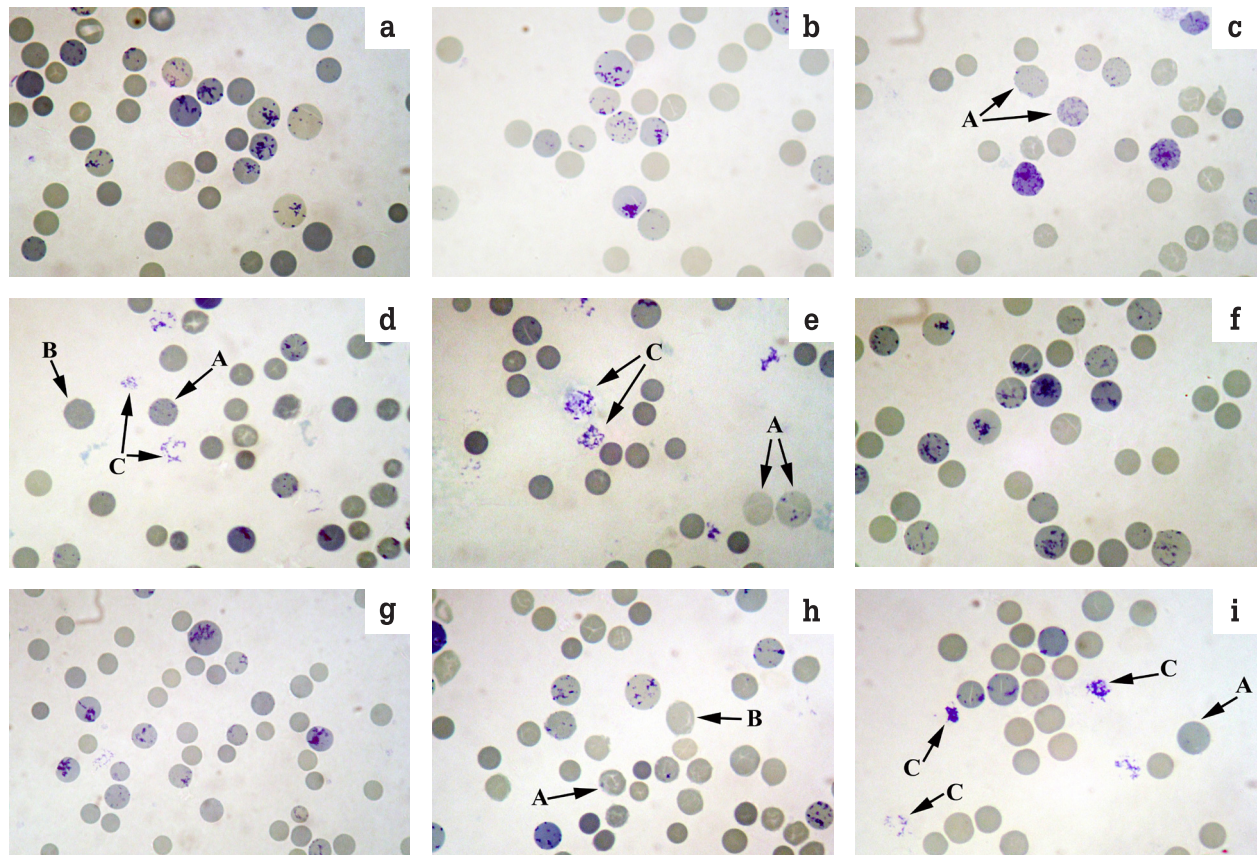


Figure 1 Reticulocyte staining from specimen stored at various time and temperature; a) 25°C_2 hr, b) 25°C_8 hr, c) 25°C_24 hr, d) 25°C_48 hr, e) 25°C_72 hr, f) 4°C_8 hr, g) 4°C_24 hr, h) 4°C_48 hr and i) 4°C_72 hr. Arrows A demonstrated the paled stain reticulocyte, arrows B demonstrated the crenated reticulocyte and arrows C demonstrated free reticulum residues

การติดสีจางลง ตะกอนเรติคูลัมไม่คมชัด ลักษณะเซลล์ปกติ เพียงร้อยละ 16.46 เซลล์เรติคูลโลไซต์เขียวและแตกเหลือเฉพาะเรติคูลัมร้อยละ 83.54 (Figure 1 f-i)

การเปรียบเทียบค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์

ผลการเปรียบเทียบค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์ จำนวน 158 ตัวอย่าง ระหว่างผลจากตัวอย่างเลือดสดกับผลจากตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C ค่าเฉลี่ยร้อยละของเรติคูลโลไซต์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลา 8 และ 24 ชั่วโมง ($p = 0.57, 0.25$ ตามลำดับ) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99 ทั้งสองช่วงเวลา แต่ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงค่าเฉลี่ยร้อยละของเรติคูลโลไซต์ แตกต่างจากผลจากตัวอย่างเลือดสด

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001, r = 0.96$) ส่วนที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สเมียร์ไม่มีคุณภาพไม่สามารถนับได้เลย สำหรับตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของเรติคูลโลไซต์ไม่แตกต่างกับผลจากตัวอย่างเลือดสดอย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลา 8, 24 และ 48 ชั่วโมง ($p = 0.30, 0.20, 0.12$ ตามลำดับ) และค่า r เท่ากับ 0.99 ทั้ง 3 ช่วงเวลา และผลจากตัวอย่างที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเรติคูลโลไซต์ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลจากตัวอย่างเลือดสด ($p < 0.001, r = 0.97$) (Table 2, Figure 2 และ 3)

ผลการวิเคราะห์ด้วย Bland Altman plot พบว่า การกระจายค่าความแตกต่างจากค่ากลางของค่าเฉลี่ยร้อยละของเรติคูลโลไซต์

Table 2 The mean percentage of reticulocyte, standard deviation (SD) and statistical analysis (paired t-test) of specimens stored at various time and temperature

Storage time (hr)	Stored at 25°C			Stored at 4°C		
	Mean	SD	p-value	Mean	SD	p-value
2	16.55	23.12	-	-	-	-
8	16.53	23.02	0.57	15.95	22.13	0.30
24	16.55	22.98	0.25	16.48	22.95	0.20
48	11.15	15.63	< 0.001	16.43	22.88	0.12
72	-	-	-	13.95	19.30	< 0.001

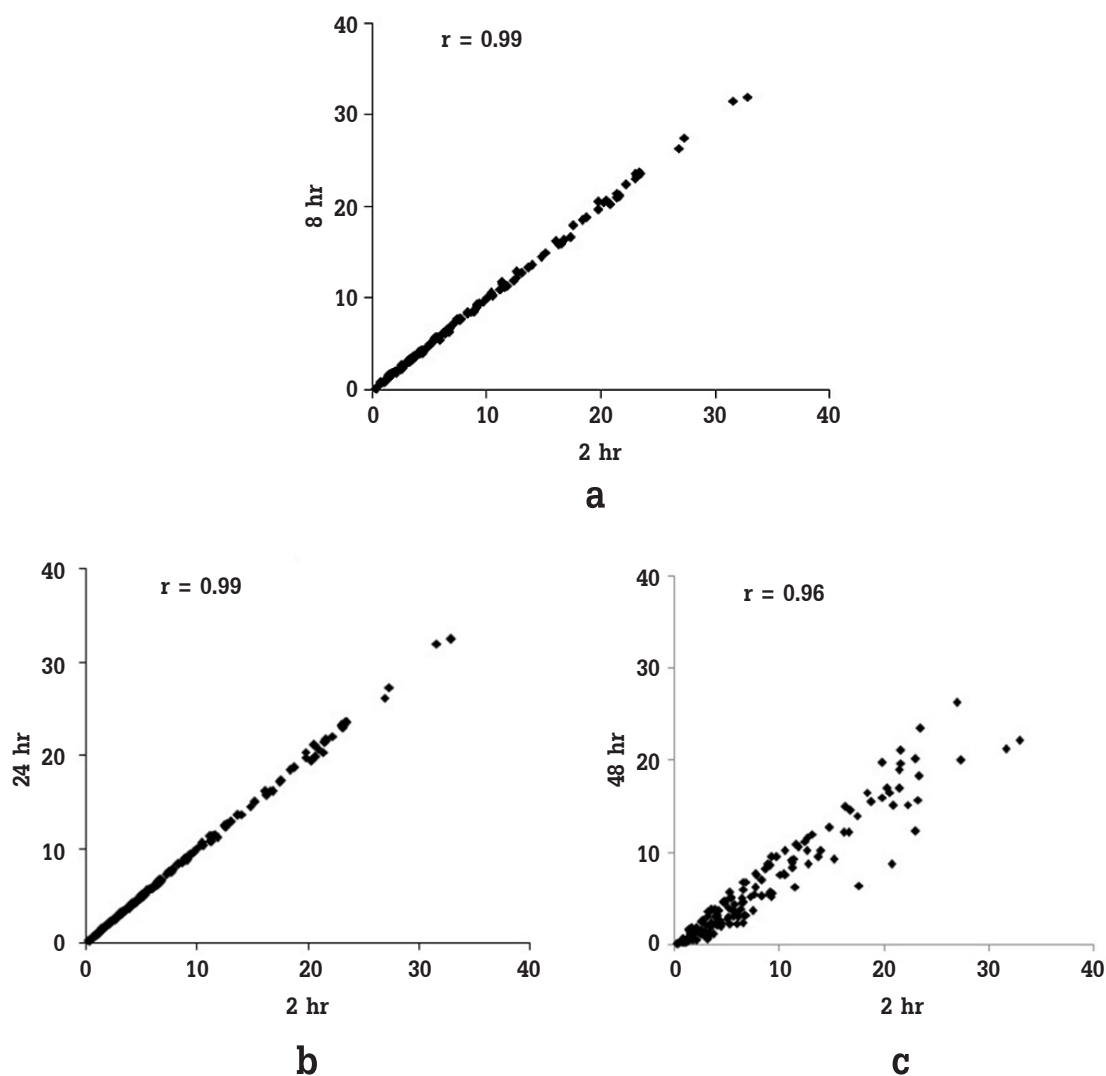


Figure 2 The correlation of the percentage of reticulocyte between fresh specimen and specimens stored at 25°C with various time; a) 8 hr, b) 24 hr and c) 48 hr

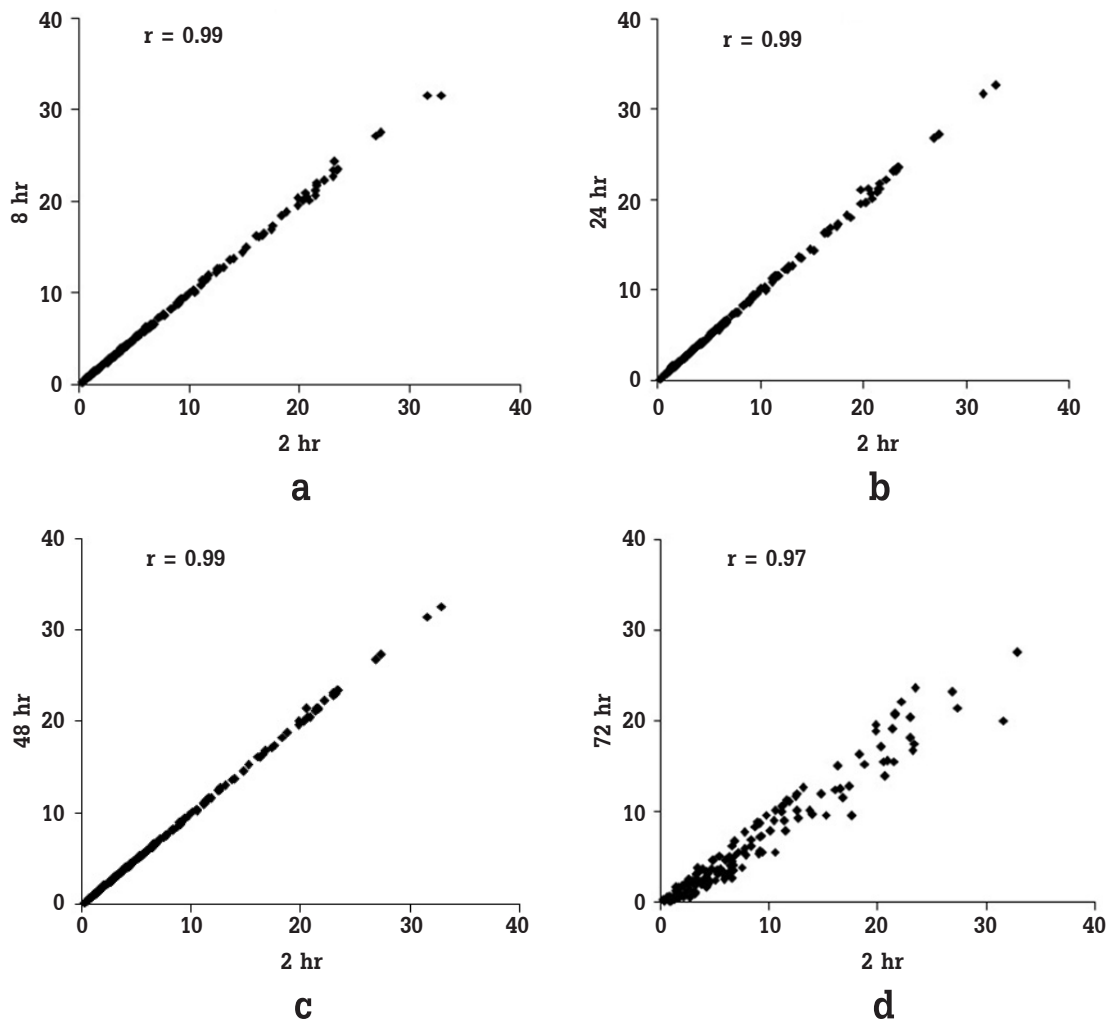


Figure 3 The correlation of the percentage of reticulocyte between fresh specimen and specimens stored at 4°C with various time; a) 8 hr, b) 24 hr, c) 48 hr and d) 72 hr

ระหว่างวิธี A (ตัวอย่างเลือดสด) กับตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิห้อง 25°C ที่ระยะเวลา 8 และ 24 ชั่วโมง (วิธี B₁, B₂) และตัวอย่างเลือดเก็บในตู้เย็นที่ 4°C ที่ระยะเวลา 8, 24 และ 48 ชั่วโมง (วิธี C₁, C₂, C₃) มากกว่าร้อยละ 95 มีการกระจายอยู่ในช่วงค่าเฉลี่ย ± 1.96 ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และมีค่าความแตกต่างของข้อมูลนอกเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (± 1.96 SD) ดังนี้ระหว่างวิธี A กับ B₁ 6 ชุดข้อมูล (0.2,0.25), (0.3,0.2), (0.75,0.85), (0.8,0.83), (1.23,1.3), (1.35,1.4), วิธี A กับ B₂ 2 ชุดข้อมูล (0.3,0.2), (0.8,0.9), วิธี A กับ C₁ 1 ชุดข้อมูล (0.2,0.3), วิธี A กับ C₂ 6 ชุดข้อมูล (0.2,0.25), (0.9,0.8), (1.2,1.1), (1.35,1.4), (1.4,1.6), (20.55,21.3) และวิธี A กับ C₃ 5 ชุดข้อมูล (0.2,0.25), (0.75,0.8), (1.23,1.2), (1.35,1.3), (1.4,1.5) (Figure 4 และ 5)

วิจารณ์

ในการศึกษาความคงตัวของเรติคูลโลไซต์ด้วยวิธีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากตัวอย่างเลือดที่ใช้สาร K₂EDTA เป็นสารกันเลือด

แข็งตัวเก็บที่อุณหภูมิ 25°C และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์จะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญและสเมียร์มีคุณภาพร้อยละ 100 ถึงระยะเวลา 8 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ สอดคล้องกับข้อเสนอแนะของ Lampasso^{4,14} ที่กล่าวว่าค่าร้อยละของเรติคูลโลไซต์ ด้วยวิธีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญใน 24 ชั่วโมงแรก อย่างไรก็ตาม Cavill และคณะ^{4,15} รายงานว่าตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บในตู้เย็น สามารถทำการทดสอบเรติคูลโลไซต์ได้ถึงระยะเวลา 72 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ เนื่องจากการศึกษาเฉพาะปริมาณไม่ได้รวมถึงการตรวจคุณภาพด้วย จึงมีความแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งพิจารณาทั้งปริมาณและคุณภาพ

ผลการทดสอบค่าความแตกต่างจากค่ากลางของค่าเฉลี่ยร้อยละของเรติคูลโลไซต์ด้วย Bland Altman plot มีค่าความแตกต่างของข้อมูลนอกเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (± 1.96 SD) มากที่สุด 6 ตัวอย่างจากข้อมูลทั้งหมด 158 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.8 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ร้อยละ 5) และทุกรายพบว่าค่าที่นับได้มี

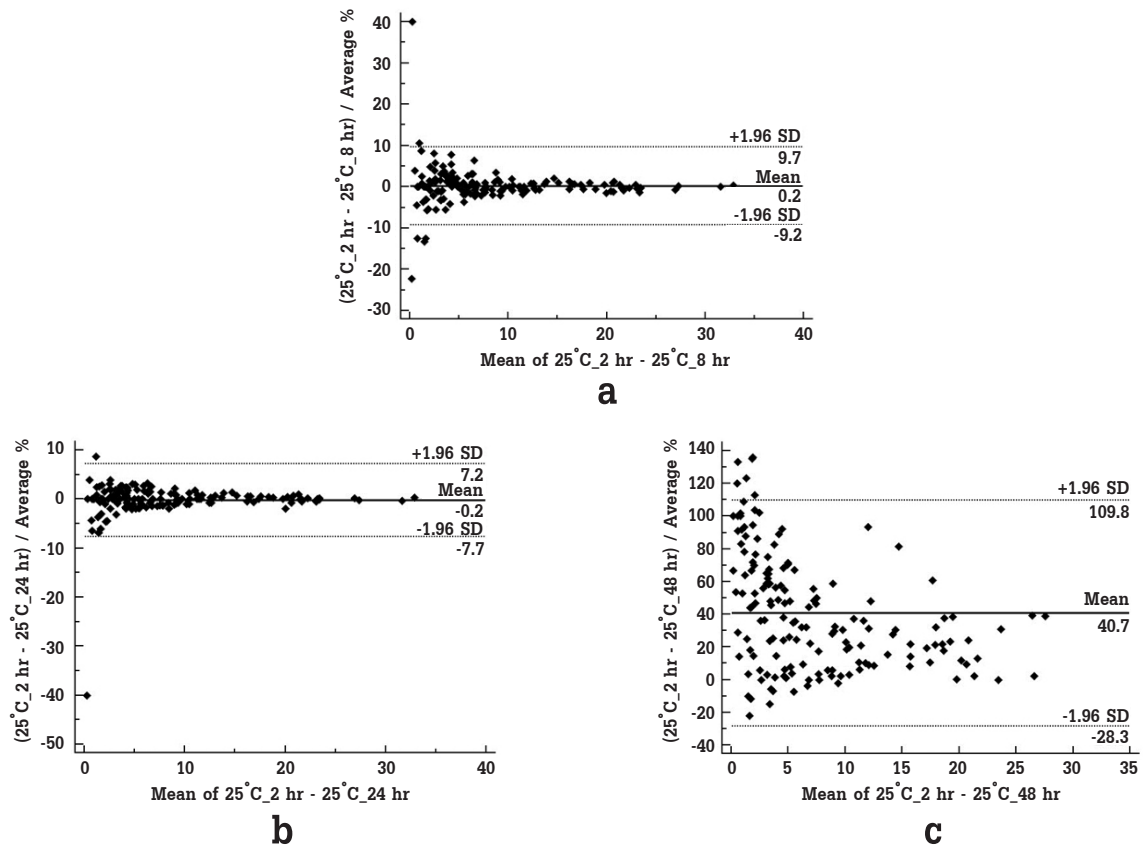


Figure 4 The bland altman plot of mean difference of the percentage of reticulocyte between fresh specimen and specimens stored at 25°C with various time; a) 8 hr, b) 24 hr and c) 48 hr

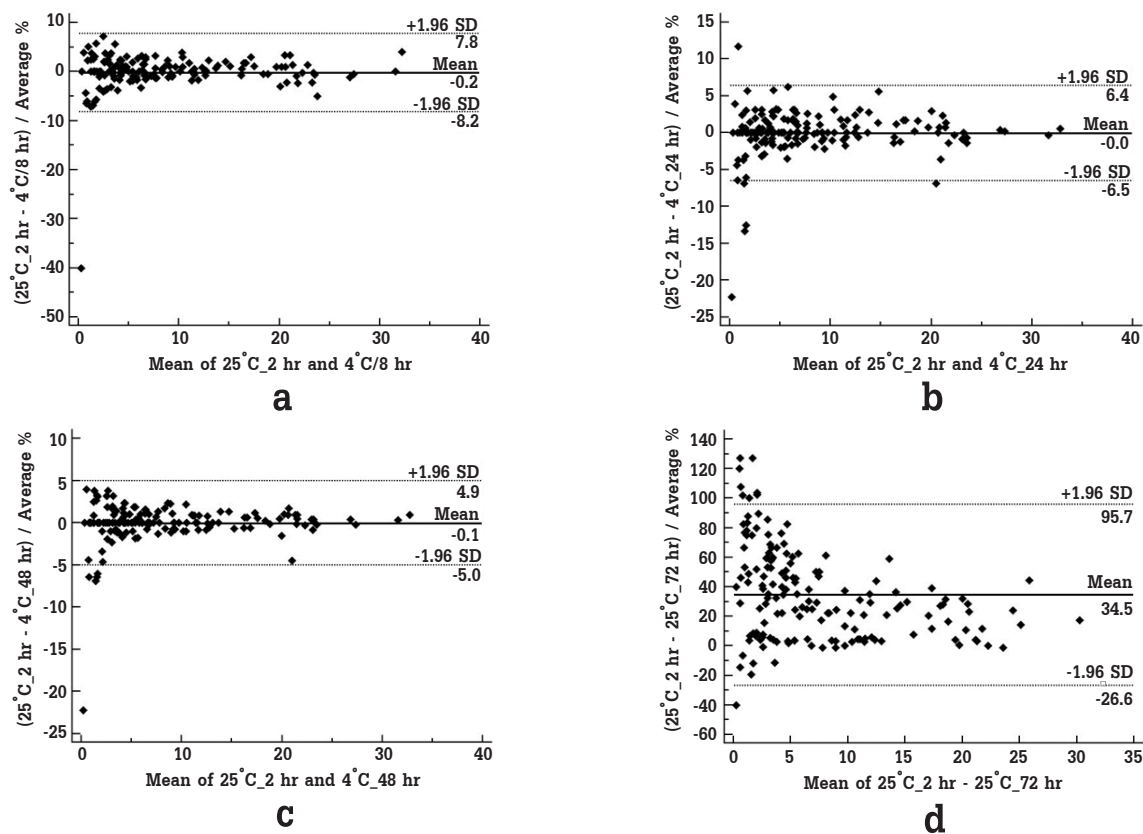


Figure 5 The bland altman plot of mean difference of the percentage of reticulocyte between fresh specimen and specimens stored at 4°C with various time; a) 8 hr, b) 24 hr, c) 48 hr and d) 72 hr

ความแตกต่างกันน้อยมาก ค่าที่ออกนอกเกณฑ์ที่ยอมรับได้เป็นค่าต่ำ ซึ่งไม่มีผลทางคลินิก สอดคล้องกับการศึกษาของนวลตา และคณะ¹⁰ ซึ่งรายงานว่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) จากตัวอย่างตรวจจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของเรติคิวโลไซต์ $\pm$ SD เท่ากับ 1.05 ± 0.10 ถึง 36.31 ± 0.40 มีค่า CV เท่ากับ 9.52-1.10% Ferguson และคณะ¹⁶ ได้ศึกษาค่าร้อยละของเรติคิวโลไซต์ในช่วงค่า 0.2-0.7 มีค่า CV = 28.0%, ช่วงค่า 4.0-5.5 มีค่า CV = 8.84% และช่วงค่า 6.1-9.9 มีค่า CV = 15.35% เห็นได้ว่าความแม่นยำในการนับจะมากขึ้นเมื่อค่าร้อยละของเรติคิวโลไซต์สูงขึ้น จึงสรุปได้ว่าค่าร้อยละของเรติคิวโลไซต์จากตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ที่ระยะเวลา 8 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ไม่แตกต่างกับตัวอย่างเลือดสด

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเลือดที่เก็บในสภาวะที่เหมาะสมสามารถนำมาย้อมด้วย 0.5% new methylene blue และตรวจนับเรติคิวโลไซต์ได้ โดยค่าที่ตรวจนับได้ไม่มีความแตกต่างจากการตรวจนับจากเลือดสด การเก็บตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ 25°C ควรทำการตรวจนับภายในเวลา 8 ชั่วโมง หรือเมื่อเก็บตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ 4°C ควรทำการตรวจนับภายในเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาค้นคว้านี้ สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการขอเพิ่มการตรวจนับเรติคิวโลไซต์ หลังทราบผล CBC จากตัวอย่างเลือดเดิมได้โดยที่ผู้ป่วยไม่ต้องถูกเจาะเลือดซ้ำ จึงช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายจากการที่ต้องถูกเจาะเลือดใหม่ ซึ่งช่วยให้งานบริการผู้ป่วยในการตรวจนับเรติคิวโลไซต์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สรุป

ผลจากการศึกษาค้นคว้านี้ยืนยันว่า ตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C ใช้นาน 8 ชั่วโมง หรือเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ใช้นาน 24 ชั่วโมง สามารถทำการตรวจนับเรติคิวโลไซต์ด้วยวิธีย้อมสี new methylene blue และนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้อย่างมีคุณภาพเทียบเท่ากับการตรวจจากตัวอย่างเลือดสด จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดเก็บและนำส่งตัวอย่างเลือดเพื่อทำการตรวจนับเรติคิวโลไซต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.พญ.ไพบรียา รุจิโรจน์จินดากุล รศ.พญ.ปารมี ทองสุกใส ผศ.ดร.จันทน์ นพรัตน์ ที่ปรึกษาโครงการ “อบรมเชิงปฏิบัติการการเขียน manuscript เพื่อตีพิมพ์ผลงานวิจัย” และ ทนพญ.ดร.โณทัย โภาคาริณ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนต้นฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

1. Prasanphanij T. *Laboratory medicine (Hematology)*. Bangkok: Thai Watana Panich Press; 1973.
2. Bunyaratavej A. *Hematology of red blood cell*. Bangkok: Funny Publishing; 1992.
3. Rojanasthien S. Reticulocyte count using manual method. In: Rojanasthien S, Rummavas S, Teerakarnchana A, Suvarnreung B, eds. *Practical Hematology*. Bangkok: Ruen Kaew Press; 1997. p. 95-9.
4. Onofrio GD, Zini G, Rowan RM. Reticulocyte counting: methods and clinical applications. In: Rowan RM, Van Assendelft OW, Preston FE, eds. *Advanced Laboratory Methods in Haematology*. London: Arnold; 2002. p. 78-126.
5. Paritpokee N. Reticulocyte count. In: Ujjan P, Siritantikorn A, Wiwanitkit V, Ausawasaksakul A, eds. *Clinical Pathology*. 2nd ed. Bangkok: Chulalongkorn University Printing House; 2007. p. 103-5.
6. Sukpanichnant S. Red blood cell disorders. In: Opartkiattikul N, Leowattana W, Wanachiwanawin D, Kunakorn M, Wongthiraporn W, eds. *Clinical Pathology*. Bangkok: Thai Society of Clinical Pathology; 2002. p. 259-71.
7. Houwen B. Reticulocyte maturation. *Blood Cells* 1992;18:167-86.
8. Hubbrd J. The erythrocyte. In: McKenzie SB, Williams JL, eds. *Clinical Laboratory Hematology*. 2nd ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education; 2010. p. 63-84.
9. Shaffer M, Kiser G, Luban NL, De Palma L. Performance of reticulocyte counts in stored blood specimens in a pediatric population utilizing new methylene blue. *Pediatr Pathol* 1993;13: 591-5.
10. Nakkarabandit N, Durmsung K, Manattiraphap L, Nopparatana C. The optimum time for reticulocyte count using supravital staining with New Methylene Blue. *Songkla Med J* 2008;26:283-9.
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. Lamchiagdhase P, Pattanapanyasat K, Tangtiyaphan W, Kulsrissombat K. Flow cytometric Reticulocyte analysis using thiazole orange. *J Med Tech Assoc Thai* 1996;24:158-66.
13. Finch CA, Marshall PN, Trobaugh FE. Method for reticulocyte counting. NCCLS approved Standard H16-P. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1985.
14. Lampasso JA. Changes in hematologic values induced by storage of Ethylenediaminetetraacetate human blood for varying periods of time. *Am J Clin Pathol* 1968;38:443-7.
15. Cavill I, Kraaijenhagen R, Pradella R, D'Onofrios G, Herkner K, Rowan RM, et al. In vitro stability of the reticulocyte count. *Clin Lab Haematol* 1996;18(Suppl 1):S9-11.
16. Ferguson DJ, Lee SF, Gordon PA. Evaluation of reticulocyte count by flow cytometry in a routine laboratory. *Am J Hematol* 1990;33:13-7.

The Stability of Reticulocyte in Blood Samples Stored at 25°C and 4°C During 72 Hours

Laddawan Manattiraphap, Kanta Durmsung, Nauanta Nakkarabandit and Chawadee Nopparatana

Hematology Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, 90110

Abstract: The amount of reticulocyte in a peripheral blood is an indicator of bone marrow erythropoietic activity. The standard method for counting reticulocyte is to stain a fresh blood sample with 0.5% new methylene blue and count under a microscope. This study aims to assess the optimum temperature and the duration of blood storage that can allow accurate reticulocyte counts. **Objective:** To compare the percentage of reticulocytes in fresh blood samples and blood samples stored at 25°C and 4°C at 8, 24, 48 and 72 hours. **Methods:** A total of 158 blood samples with 0.2-32.9% reticulocytes were used to evaluate reticulocyte counts stored at the indicated temperatures and time points. **Results:** The reticulocyte count of fresh blood samples were not significantly different from those stored at 25°C up to 8 hours ($p = 0.57$, $r = 0.99$) or at 4°C up to 24 hours ($p = 0.20$, $r = 0.99$). The quality of reticulocyte staining in the smears at both time points was 100%. **Conclusion:** The reticulocyte count from in blood samples stored at 25°C for 8 hours or 4°C for 24 hours were as accurate as fresh samples.

Keywords : ● Reticulocyte count ● Time ● Temperature ● New methylene blue

J Hematol Transfus Med 2014;24:269-76.