นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบการใช้น้ำยา Lysing Solutions 3 ชนิด สำหรับตรวจนับประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ในผู้ป่วยโรคเอดส์โดยวิธีโฟลไซโตเมทรี

ปราโมทย์ นาวีวงษ์พนิต*

บทคัดย่อ

การตรวจหาประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ในผู้ป่วยโรคเอดส์โดยวิธีโฟลไซโตเมทรี ปัจจุบันทำได้โดยการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดต่างๆ และน้ำยาแตกเม็ดเลือดแดง (Lysing solution) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เตรียม Lysing solution 2 ชนิดขึ้นเอง ได้แก่ Ammonium chloride และ Tris-ammonium chloride เมื่อเปรียบเทียบการตรวจหาประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ในผู้ป่วยโรคเอดส์โดยใช้ Lysing solution ทั้ง 2 ชนิดที่เตรียมขึ้นเองกับ Lysing solution ของบริษัทเบคตัน ดิคคินสัน พบว่า จำนวนเซลล์ CD3, CD4 และ CD8 ในเลือดผู้ป่วยเอดส์จากโรงพยาบาลนครพิงค์ จำนวน 106 ราย แยกเป็นเพศชายอายุระหว่าง 20-50 ปี จำนวน 68 ราย และเพศหญิงอายุระหว่าง 19-45 ปี จำนวน 38 คน ได้ค่า Absolute number และ Converted % lymphocytes ของทั้ง CD3, CD4 และ CD8 cells ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.985 Lysing solution ที่เตรียมเองนี้ใช้สารเคมีพื้นฐานที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการทั่วไป และราคาถูก เตรียมได้ง่าย และสามารถเก็บไว้ได้นาน การเตรียม Lysing solution ขึ้นมาใช้เองเพื่อตรวจหาประชากรกลุ่มย่อยของลิมโฟไซท์ จะทำให้ประหยัด งบประมาณในการจัดซื้อน้ำยาสำเร็จรูปลงได้

คำหัส : โฟลไซโตเมทรี, น้ำยาแตกเม็ดเลือดแดง, ประชากรย่อยของลิมโฟไซท์, โรคเอดส์

*กลุ่มงานพยาธิคลินิก งานภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก โรงพยาบาลนครพิงค์ เชียงใหม่

Abstract: Comparison of 3 Lysing Solutions for Enumeration of Lymphocyte Sub-populations in AIDS Patients by Flow Cytometry

Naveewongpanit P*

Enumeration of sub-populations of lymphocytes in AIDS patients by flow cytometer is carried out by using commercial reagent kit which composed of antibodies and red blood cell lysing solution. To reduce the reagent cost, in this study, ammonium chloride and Tris-ammonium chloride lysing solutions were prepared and compared to the commercial lysing solution obtained from Becton Dickinson in enumeration of CD3, CD4 and CD8 cells. In this investigation, 106 AIDS patients from Nakornping Hospital, including 68 males aged 20-50 and 38 females aged 19-45, were studied. By using 3 lysing solutions, the absolute number and converted % lymphocytes of all sub-population tested were not different with the correlation coefficient more than 0.985. The prepared lysing solutions composed of common inexpensive chemicals which were available in all hospital laboratories. These lysing solutions were easy to prepare and stable. The in-house preparation of red blood cell lysing solutions, therefore, resulted in reduction of some expenses.

Key words: Flow cytometry, Lysing solution, Lymphocyte sub-population, AIDS

* Clinical Immunology Section, Department of Clinical Pathology, Nakornping Hospital, Chiang Mai.

บทนำ

การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อตรวจนับจำนวนประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ (Immunophenotyping) มีจุดประสงค์เพื่อติดตามภาวะภูมิต้านทานโรคในผู้ติดเชื้อเอชไอวี และผู้ป่วยเอดส์ เพื่อแยกระดับความรุนแรงของโรค พร้อมทั้งใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การรักษา และประเมินผลการรักษาโรค[1-5] ในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ลิมโฟไซท์ (Lymphocyte) จัดเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญมาก ซึ่งเซลล์ลิมโฟไซท์เหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ T lymphocytes (CD3 cells) และ B lymphocytes (CD19 cells) โดยที่บนผิวของเซลล์ T lymphocytes มีโปรตีนชนิด CD3 ขณะที่เซลล์ B lymphocytes มีโปรตีนชนิด CD19 อยู่บนผิวเซลล์[6] เซลล์ T lymphocytes ยังสามารถแยกได้เป็นกลุ่มประชากรย่อย 2 กลุ่มคือ T-helper/inducer (CD4 cells) และ T-suppressor/cytotoxic (CD8 cells) โดยบนผิวเซลล์ทั้ง 2 จะมี CD4 และ CD8 โปรตีนอยู่บนผิวเซลล์ตามลำดับ ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีพบว่า CD4 cells จะลดจำนวนลง[7-9] และเมื่อลดลงถึงระดับหนึ่งผู้ติดเชื้อจะมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้นจำนวนเซลล์ชนิด CD4 จึงสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยได้เป็นอย่างดี[10-12] จำนวน T Lymphocytes ชนิด CD3, CD4 และ CD8 cells นั้นมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาของการติดเชื้อ โดยจำนวน CD4 cells จะลดลงตลอดระยะเวลาและรวดเร็ว จนเข้าระยะสุดท้ายคือเป็นโรคเอดส์เต็มขั้นส่วนจำนวน CD8 cells นั้นจะเพิ่มขึ้นในระยะแรกและจะค่อยๆ ลดลงในระยะสุดท้าย พร้อมทั้งมีบทบาทในการกระจายเชื้อเอชไอวี ไปยัง CD4 cells ที่ยังไม่ติดเชื้ออีกด้วย[13]

วิธีการหาค่าประชากรย่อยของลิมโฟไซท์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ E-Rosetting เพื่อแยก T-Lymphocyte ออกจากประชากรย่อย (Sub-population) ของลิมโฟไซท์ชนิดอื่น[14] การใช้โมโนโคลนัล แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงแล้วตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนท์ (Fluorescent microscope)[15] หรือตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer[13] วิธีการตรวจดังกล่าวมีความแตกต่างกันทั้งข้อดีและข้อเสีย โดยปัจจุบันวิธีโฟลไซโตเมทรีนับเป็นวิธีที่ให้ค่าที่เชื่อถือได้และเป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือต้องใช้น้ำยาในการตรวจวิเคราะห์ที่มีราคาแพงมาก

เพื่อลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ จึงได้ศึกษาการเตรียมน้ำยาแตกเม็ดเลือดแดง (Lysing solution) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ขึ้นมาใช้เอง โดยได้เตรียมน้ำยาขึ้นมา 2 ชนิดคือ Ammonium chloride[16] และ Tris-ammonium chloride[17] แล้วนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับน้ำยา Lysing solution ของบริษัท Becton Dickinson

วัสดุและวิธีการ

1. ชุดน้ำยา โมโนโคลนัลแอนติบอดี SimulTest และ น้ำยา Lysing solution ของบริษัท Becton Dickinson (Moutain View, CA) ได้แก่

1.1 SimulTest™ Leucogate CD45/CD14 (Anti-HLe-I.FITC/Leu™-M3.PE)

1.2 SimulTest™ Control γ1/γ2a (IgG1.FITC/IgG2a.PE)

1.3 SimulTest™ CD3/CD4 (Leu™ 4.FITC/Leu-3a.PE)

1.4 SimulTest™ CD3/CD8 (Leu™ 4.FITC/Leu-2a.PE)

1.5 FACS Lysing solution (10x) ในการศึกษานี้เรียกว่า Lysing solution A

FACS Lysing solution (10x) ของบริษัท Becton Dickinson นี้ นำมาเจือจางเป็น 1:10 ด้วยน้ำกลั่นชนิด Reagent grade ก่อนใช้ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 เดือน

2. Ammonium chloride lysing solution ในการศึกษานี้เรียกว่า Lysing solution B มีส่วนประกอบคือ

NH_4Cl G.R. (Merck, Darmstadt, Germany) 8.26 กรัม, $KHCO_3$ G.R. (Merck) 1.27 กรัม และ EDTA G.R. (Merck) 0.0037 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น (Reagent-grade) ครบ 1 ลิตรเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 3 เดือน

3. TRIS-ammonium chloride lysing solution ในการศึกษานี้เรียกว่า Lysing solution C มีส่วนประกอบคือ

3.1 NH_4Cl G.R. (Merck) 8.3 กรัม ละลายน้ำกลั่น (Reagent grade) ครบ 1 ลิตร

3.2 Tris (Hydroxymethyl-aminomethane) (Merck) 10.3 กรัม ละลายน้ำกลั่น (Reagent-grade) ครบ 500 mL.

ผสมน้ำยา NH_4Cl Solution กับ Tris solution อัตราส่วน 1:11 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 3 เดือน

4. สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) มีส่วนประกอบคือ

NaCl G.R. (Merck) 8.0 กรัม, KCl G.R (Merck) 0.1 กรัม, Na_2HPO_4 G.R. (Merck) 1.2 กรัม และ KH_2PO_4 G.R. (Merck) 0.3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น (Reagent grade) ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.2

5. สารละลาย PBS-0.1% Sodium azide: นำสารละลาย PBS มาเติม sodium azide ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1%

6. สารละลาย PBS - 0.5% Paraformaldehyde: นำสารละลาย PBS มาเติม Paraformaldehyde ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5%

7. Sheath fluid (HAEMA LINE 2)

8. CALiBRITE™ beads (Becton Dickinson)

9. Flow cytometer FACScan (Becton Dickinson)

10. การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood sample)

ใช้หลอด K_3EDTA vacutainer tubes ขนาด 2 มล. เจาะเลือดผู้ป่วยทางหลอดเลือดดำที่แขน เก็บเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจ CBC ด้วยเครื่อง Coulter MAX M และทำการย้อมเซลล์ในตัวอย่างเลือดตามวิธีในข้อ 11 สำหรับตัวอย่างเลือดที่ไม่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ ตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้นานเกิน 30 ชั่วโมง เลือดที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงหรือมีการแข็งตัวของเลือด

11. การย้อมเซลล์เม็ดเลือดขาว

11.1 เตรียมหลอดขนาด 12x75 มม. Falcon capped polyslyrene tubes 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 : หลอด 1A, 2A, 3A, 4A สำหรับน้ำยา Lysing solution ชนิด A

ชุดที่ 2 : หลอด 1B, 2B, 3B, 4B สำหรับน้ำยา Lysing solution ชนิด B

ชุดที่ 3 : หลอด 1C, 2C, 3C, 4C สำหรับน้ำยา Lysing solution ชนิด C

11.2 เติมน้ำยา SimulTest ™ Leuco gate 20 μL ลงในหลอด 1A, 1B, 1C

11.3 เติมน้ำยา SimulTest™ Control $\gamma1/\gamma2a$ 20 μL ลงในหลอด 2A, 2B, 2C

11.4 เติมน้ำยา SimulTest™ CD_3/CD_4 20 μL ลงในหลอด 3A, 3B, 3C

11.5 เติมน้ำยา SimulTest™ CD_3/CD_8 20 μL ลงในหลอด 4A, 4B, 4C

11.6 เติมตัวอย่างเลือด 100 μL ลงในทุก

หลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer นำไปไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

11.7 เติม Lysing solution A (Diluted FACS lysing solution) 2 มล. ลงในหลอด 1A, 2A, 3A, 4A

11.8 เติม Lysing solution B (NH_4Cl lysing solution) 2 มล. ลงในหลอด 1B, 2B, 3B, 4B

11.9 เติม Lysing solution C (Tris-NH_4Cl) 2 มล. ลงในหลอด 1C, 2C, 3C, 4C

11.10 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer ที่ความเร็วต่ำนานหลอดละ 3 วินาทีจนครบทุกหลอด นำไปเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

11.11 เมื่อครบกำหนดเวลาให้รีบนำมาเขย่าอีกครั้งด้วยเครื่อง Vortex mixer แล้วปั่นตกตะกอนทันที ที่ 200g เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำส่วนใสข้างบนออกให้หมดทุกหลอด

11.12 เติมน้ำยา PBS-0.1% Sodium azide 2 มล. ลงในทุกหลอดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer นำไปปั่นด้วยความเร็ว 200g นาน 5 นาที เทน้ำส่วนใสข้างบนออกให้หมดทุกหลอด

11.13 เติมน้ำยา PBS-0.5% Paraformaldehyde 0.5 มล. ลงในทุกหลอดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer นำไปปิดฝาทุกหลอดห่อด้วย Aluminum foil แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °ซ เป็นเวลานานอย่างน้อย 2 ชั่วโมงหรือไม่เกิน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer

12. การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดเพื่อหาประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยใช้ SimulSet software (Becton Dickinson) โดยทำการ Gate กลุ่มเซลล์ลิมโฟไซท์โดยอาศัยขนาด (FSC) และ Granularity (SSC) จากนั้นนำ Gated lymphocytes มาวิเคราะห์หาเซลล์ที่เรืองแสง FITC และ PE ด้วย FL1 และ FL2 ตามลำดับ ในการวิเคราะห์หาประชากรของลิมโฟไซท์ดังกล่าวนี้ ใช้หลอดแรกที่ย้อมด้วย Leucogate ปรับหากลุ่มเซลล์ทั้งหมดก่อน โดยให้เซลล์จำนวนหนึ่งไหลผ่านเครื่อง Flow cytometer ทำการปรับแต่ง FSC/SSC ของ CD45-FITC/CD14-PE cells ให้ได้กลุ่มเซลล์ทั้งหมดคือลิมโฟไซท์, โมโนไซท์, แกรนูโลไซท์ และเศษเซลล์เม็ดเลือดแดง (Debris) ซึ่งเศษเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นใช้ FSC Threshold ปรับตัดออกไป ใช้ Manual gate ตีกรอบเลือกกลุ่มเซลล์ลิมโฟไซท์ โดยต้องมีเซลล์ลิมโฟไซท์อยู่ใน Gate ไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 แต่ถ้ามีเซลล์ ลิมโฟไซท์ต่ำกว่าที่กำหนดต้องทำการหา Lymphocyte gate ใหม่อีกครั้งให้ได้ตามที่กำหนด แล้วใช้หลอดที่ย้อมด้วย $\gamma1/\gamma2$ (IgG1 FITC/IgG2aPE) ซึ่งเป็น Isotype control negative antibody ปรับเครื่องเพื่อหาขอบเขตของกลุ่มเซลล์ที่ไม่ติดสี แล้วใช้หลอดที่ 3 ที่ย้อมด้วย CD3/CD4 วิเคราะห์หาค่า CD3 และ CD4 cells ได้ออกมาเป็น ค่าอัตรา ร้อยละ (Converted % Lymphocytes) และค่าสัมบูรณ์ (Absolute number) มีหน่วยเป็น Cells/μL ทำนองเดียวกันใช้หลอดที่ 4 ที่ย้อมด้วย CD3/CD8 วิเคราะห์ค่า CD3 และ CD8 cells โดยได้ออกมาเป็นค่า Converted % lymphocytes และค่าสัมบูรณ์

ผลการทดลอง

จากการตรวจนับจำนวน CD3, CD4 และ CD8 cells ในเลือดผู้ป่วยโรคเอดส์ของโรงพยาบาลนครพิงค์จำนวน 106 ราย แยกเป็นผู้ป่วยเพศชายอายุระหว่าง 20-50 ปี จำนวน 68 ราย และเพศหญิง อายุระหว่าง 19-45 ปี จำนวน 38 ราย

โดยศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้ Lysing solution ที่เตรียมเอง 2 ชนิด (คือ Lysing solution B ; Ammonium chloride[16] และ Lysing solution C; TRIS-ammonium chloride[18]) กับ Lysing solution จากบริษัท Becton Dickinson (Lysing solution A) ได้ผลการทดลองไม่ต่างกันดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ของค่า CD3, CD4 และ CD8 cells โดยใช้ Lysing solution ทั้ง 3 ชนิด มีค่าเกิน 0.985 ทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 1

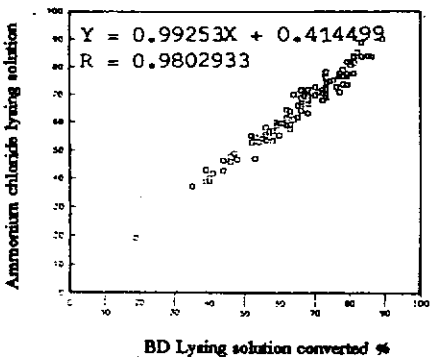
ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่ใช้ Lysing solution A, B และ C ของผู้ป่วยเอดส์ พบว่า FACS profile ที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกันทั้งตำแหน่งของกลุ่มเซลล์, ขนาด และปริมาณเซลล์ ดังตัวอย่างของผู้ป่วยรายหนึ่ง ในรูปที่ 3 และ 4

วิจารณ์

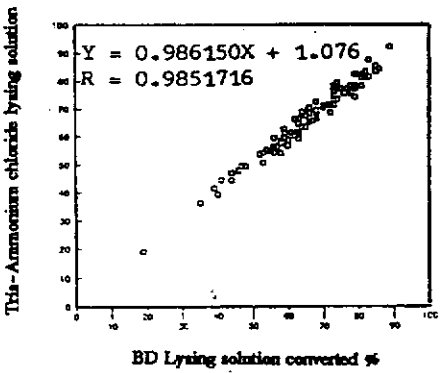
การตรวจหาประชากรย่อยของเซลล์ลิมโฟไซท์โดยวิธีการย้อมด้วยโมโนโคลนัล แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสาร FITC และ PE แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer นั้นมีข้อดีคือทำได้สะดวกรวดเร็ว และให้ผลแม่นยำถูกต้องกว่าวิธีอื่นๆ จึงใช้เป็นวิธีมาตรฐานในปัจจุบัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ น้ำยาทุกชนิดและเครื่องมือวิเคราะห์พร้อมทั้งอุปกรณ์ต่างๆ ล้วนมีราคาแพงมาก การศึกษาครั้งนี้จึงได้เตรียมน้ำยา 2 ชนิดคือ น้ำยา Ammonium chloride และน้ำยา Tris-ammonium chloride ขึ้นมาเพื่อใช้แทน Lysing solution ของบริษัท Becton Dickinson ซึ่งใช้เป็นน้ำยามาตรฐาน เพื่อให้ราคาการตรวจวิเคราะห์ลดลง น้ำยา Ammonium chloride และน้ำยา Tris-ammonium chloride ที่เตรียมขึ้นทั้งสองชนิด เป็นสารละลาย Hypotonic buffer ที่สามารถแตกเม็ดเลือดแดงแต่ไม่มีผลกับเซลล์เม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือด[16-17]

การตรวจนับประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ในการศึกษานี้ใช้ชุดน้ำยา SimulTest และใช้วิธีการย้อมเซลล์ที่เรียกว่า Whole Blood Lysis (WBL) มีวิธีการทำคือย้อมตัวอย่างเลือด (Whole blood) ด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี แล้วแตกเม็ดเลือดแดงออกด้วย Lysing solution จากนั้นตรวจวิเคราะห์ประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ด้วยเครื่อง Flow cytometer วิธีนี้ทำได้สะดวกรวดเร็วไม่ต้องใช้ Density gradients ในการแยกเม็ดเลือดขาว รวมทั้งไม่ทำให้ประชากรย่อยของลิมโฟไซท์บางชนิดสูญหาย สามารถวิเคราะห์ได้ค่าเซลล์ สัมบูรณ์ และ Converted % lymphocytes ของ CD3, CD4 และ CD8 cells ได้ จะเห็นได้ว่าวิธีนี้จำเป็นต้องใช้ Lysing solution เพื่อแตกเม็ดเลือดแดงออกก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่าน้ำยาที่เตรียมขึ้นมานี้สามารถนำมาตรวจนับจำนวน CD3, CD4 และ CD8 cells โดยได้ค่าที่ไม่แตกต่างจากการใช้ Lysing solution จากบริษัทโดยเมื่อเปรียบเทียบพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.985

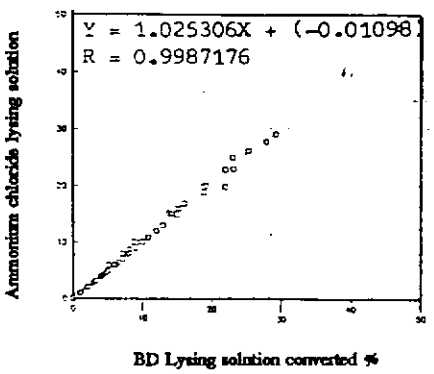
ปัญหาการวิเคราะห์ที่พบคือ ตัวอย่างเลือดบางรายเม็ดเลือดแดงแตกได้ไม่สมบูรณ์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากผู้ป่วยได้รับยา AZT หรือยาปฏิชีวนะหลายชนิดร่วมกัน ทำให้เม็ดเลือดแดงทนทานต่อกระบวนการ Lysis และปะปนเข้ามาในกรอบ (Gate) ของกลุ่มเซลล์ ลิมโฟไซท์มากเกินไป ทำให้ค่าเซลล์ลิมโฟไซท์ไม่ใช่ค่าที่แท้จริง กรณีดังกล่าวนี้ ผู้วิเคราะห์ต้องทำ Manual gate อีกครั้งเพื่อตัดกลุ่มเซลล์อื่นๆ ที่ไม่ใช่ลิมโฟไซท์ออกให้มากที่สุด โดยอาศัยหลักการ ที่กลุ่มประชากรย่อยของลิมโฟไซท์จะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี CD45 และกลุ่มเซลล์โมโนไซท์จะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้ง CD45 และ CD14 ได้ จากการ Gate ใหม่ให้มีกลุ่มลิมโฟไซท์ที่บริสุทธิ์ตามเกณฑ์คือ (มากกว่าร้อยละ 90



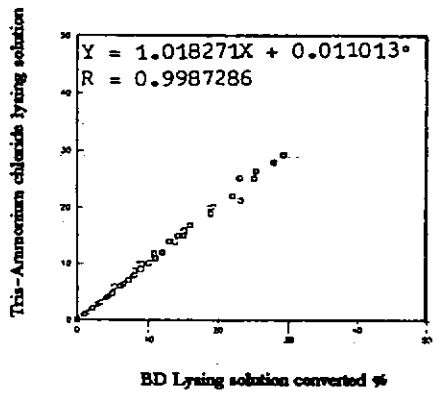
แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD3
ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ B



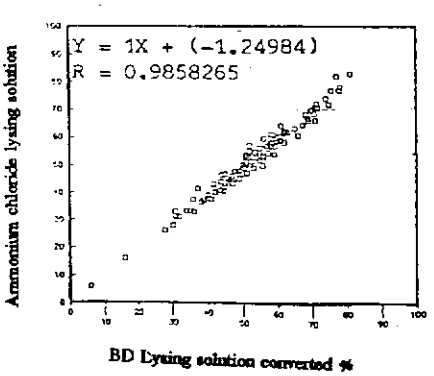
แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD3
ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ C



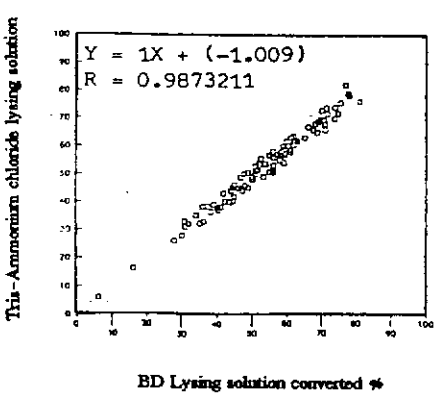
แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD4
ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ B



แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD4
ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ C

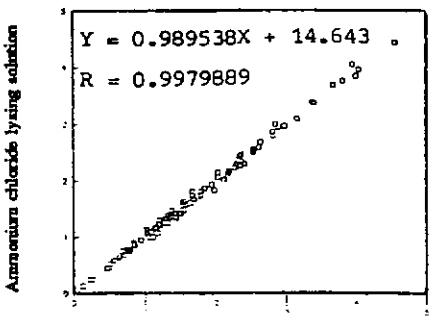


แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD8
ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ B

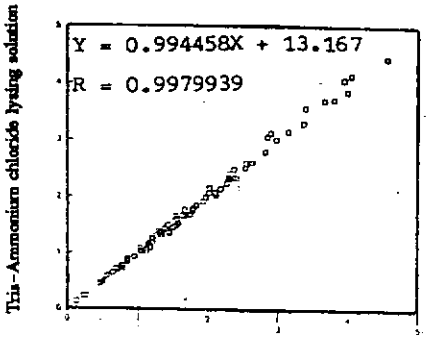


แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD8
ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ C

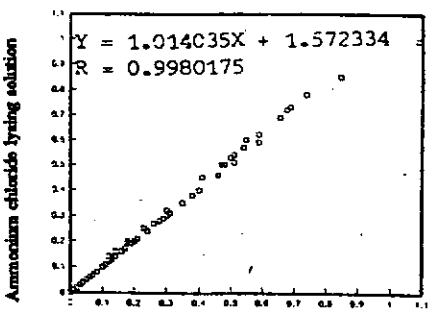
รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Converted % lymphocytes ของ CD3, CD4 และ CD8 cells โดยใช้ Lysing solution A (FACS Lysing solution ของ Becton Dickinson), Lysing solution B (Ammonium chloride) และ Lysing solution C (TRIS-ammonium chloride)



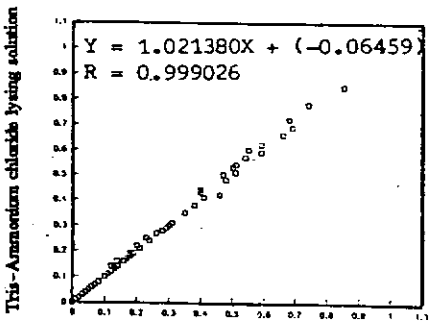
แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD3 ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ B



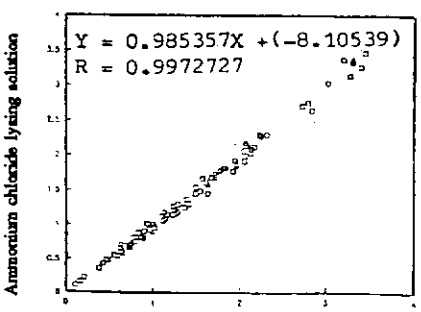
แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD3 ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ C



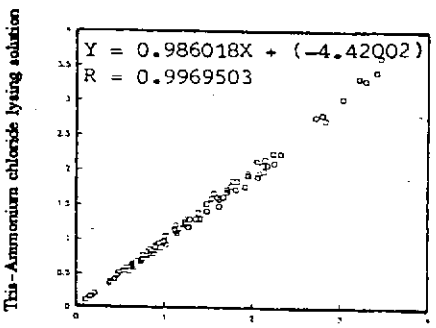
แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD4 ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ B



แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD4 ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ C



แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD8 ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ B



แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของค่า CD8 ระหว่างน้ำยา Lysing solution A กับ C

รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Absolute number ของ CD3, CD4 และ CD8 cells โดยใช้ Lysing solution A (FACS Lysing solution ของ Becton Dickinson), Lysing solution B (Ammonium chloride) และ Lysing solution C (TRIS-ammonium chloride)

ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของ CD3, CD4 และ CD8 cells โดยใช้ Lysing solution A (FACS lysing solution ของ Becton Dickinson) กับ Lysing solution B (Ammonium choride) และ Lysing solution C (Tris-ammonium chloride)

Cells	Lysing solution	r Cells/μL	r Converted % lymphocytes
$CD3^+$	A และ B	0.998	0.980
	A และ C	0.998	0.985
$CD4^+$	A และ B	0.998	0.999
	A และ C	0.990	0.999
$CD8^+$	A และ B	0.997	0.986
	A และ C	0.997	0.987

ของเซลล์ใน Gate ค่าประชากรย่อยของลิมโฟไซท์ที่ได้จึงใช้เป็นฐานในการคำนวณหากลุ่มประชากรย่อยของลิมโฟไซท์อื่นๆ ได้ถูกต้องขึ้น ในตัวอย่างเลือดดังกล่าวนี้ Lysing solution ที่เตรียมขึ้นเองทั้ง 2 ชนิดก็ให้ผลที่ใกล้เคียงกับการใช้ Lysing solution ของบริษัท

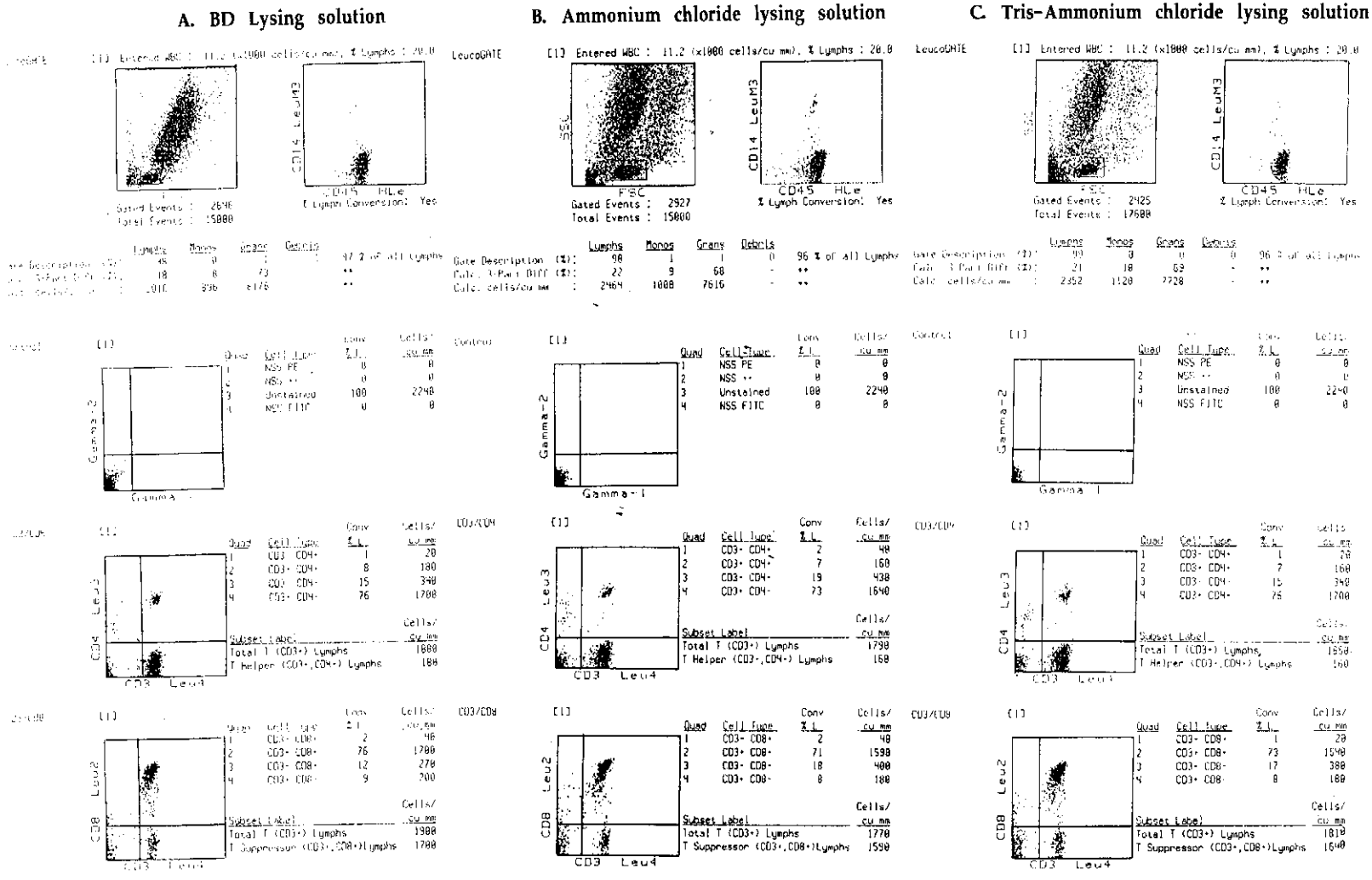
การศึกษา ครั้งนี้สรุปได้ว่าน้ำยา Ammonium chloride และ Tris-ammonium chloride ที่เตรียมขึ้นมาสามารถใช้แทน Lysing solution ของบริษัท Becton Dickinson ได้ Lysing solution ทั้งสองนี้ใช้สารเคมีพื้นฐานที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการทั่วไปและราคาถูก เตรียมได้ง่ายและสามารถเก็บได้นาน การใช้น้ำยาดังกล่าว แทนการซื้อจากบริษัทจะทำให้ต้นทุนในการตรวจลดลงและประหยัดงบประมาณได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลนครพิงค์ และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานพยาธิคลินิกทุกท่านที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ รศ.ดร.วัชระ กสิณฤกษ์ ที่ให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัยและแก้ไขรายงานวิจัยครั้งนี้

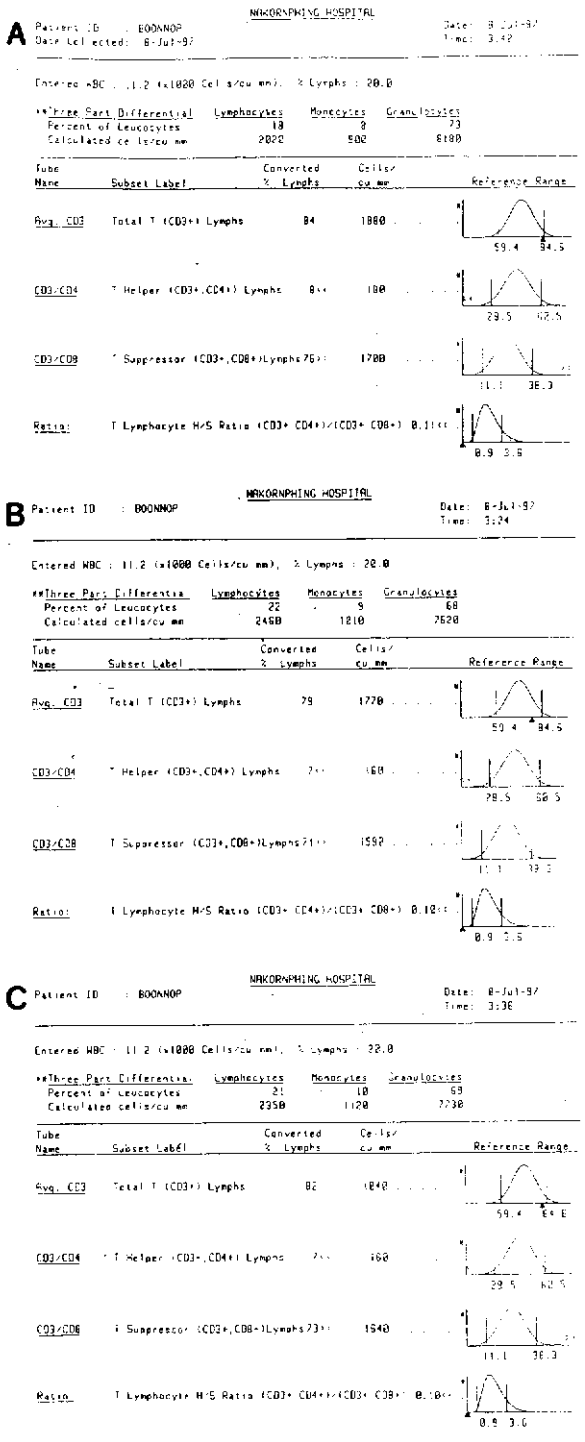
เอกสารอ้างอิง

1. Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance of definition for AIDS among adolescent and adults. MMWR 1992; 41 (No.RR-17): 1-19.
2. MacDonell KB, Chmiel JS, Poggenseel L, *et al.* Predicting progression to AIDS: combined usefulness of CD4 lymphocyte count and p24 antigenemia. Am J Med 1990; 89: 706-12.
3. National Institute of Health. State of the art conference on azidothymidine therapy for early HIV infection. Am J Med 1990; 89: 335-44,.
4. Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, *et al.* Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection: A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4 positive cells per cubic millimeter. N Eng J Med 1990; 322: 941-9.



รูปที่ 3 แสดง FACS profile ที่ได้จากการตรวจนับ CD3, CD4 และ CD8 cells โดยเครื่อง Flow cytometer ของผู้ป่วยหนึ่งราย

A แสดง FACS profile เมื่อใช้ Lysing solution A (FACS Lysing solution ของ Becton Dickinson).
B แสดง FACS profile เมื่อใช้ Lysing solution B (Ammonium chloride lysing solution)
C แสดง FACS profile เมื่อใช้ Lysing solution C (TRIS-ammonium chloride lysing solution)



รูปที่ 4 แสดงค่า Absolute number และ Converted % lymphocytes ของ CD3, CD4 และ CD8 cells จากรูปที่ 3 (อักษร A, B และ C ดังแสดงใน รูปที่ 3)

5. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prophylaxis against *Pneumocystic carrinii* pneumonia for adults and adolescents infection with human immunodeficiency virus. MMWR 1992; 41 (No.RR-4): 1-11.
6. John SC, Ronald SW. Diagnostic Flow Cytometer, Williams&Wilkins, 1991, New York, USA.
7. Hidd PG, Vog T. Report of the workshop on the evaluation of T cell subset during HIV infection and AIDS. Clin Immunopathol 1989; 52: 3-9.
8. Stahl RE, Friedman-Kien A, Dubin R, Marmor M, Zolla-Pazner S, Immunologic abnormality in homosexual men relationship to Kaposi's sarcoma. Am J Med 1982; 73: 171-8.
9. Schroff R, Gottlieb MS, Prince HE, Chaill, Fahey JL. Immunological studies of homosexual men with immunodeficiency and Kaposi's sarcoma. Clin Immunol Immunopathol 1983; 27: 300-14.
10. Fahey JL, Giogi J, Martinez-Maza O, Detds R, Taylor J. Immunopathogenesis of AIDS and Related Syndromes. In: Acquired Immunodeficiency Syndromes. Gluckman JC, Vilmer E(eds). Elsevier, Paris, 1987: 107-14.
11. Andrien JM, Eme D, Venet A, *et al.* Serum HIV antigen and anti-p24-antibodies in 200 seropositive patients: correlation with CD4 and CD8 subsets. Clin Exp Immunol 1988; 73: 1-5.
12. Polk MD, Fox R, Brookmeyer R, *et al.* Predictors of the acquired immunodeficiency

syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. N Engl J Med 1987; 316: 61-6.

13. Parker J, Adelsberg B, Azen SP, *et al.* Leucocyte immunophenotyping by flow cytometer. Clin Immunopathol 1990; 55: 187-200.
14. Carosella ED, Mochanko K, Braun M, Rosette T. Cells in human peripheral blood at different ages. Cell Immunol 1974; 12: 323-5.
15. Mascart-Lemone F, Delespesse G, Servais G, Kunstler M. Characterization of immunoregulatory T lymphocyte during aging by monoclonal antibodies. Clin Exp Immunol 1982; 48: 148-54.
16. Muirhead KR, Wallace PK, Schmitt TC, Rescatorr RL, Ranco JA, Horan PK. Methodological considerations for implementation of lymphocytes subset analysis in a clinical reference laboratory. In. Clinical Cytometer. Reeff M(ed.). Acad Sci, New York 1986: 113-27.
17. Hunt SV. Preparation of Lymphocytes: A Practical Approach. Klaus GGB (ed). IRL Press Oxford 1989: 24-5.