

บันทึก

การควบคุมคุณภาพภายใน

ของการตรวจสอบแผ่นสเมียร์เลือด

ประสิทธิ์ ชะวีรัมย์ และ ศุภดา ไชยสวัสดิ์

การตรวจสอบสเมียร์เลือดได้แก่ การดูจำนวน การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว การดูรูปร่างของเม็ดเลือดแดง การดูขนาด จำนวน และคุณสมบัติของเกร็ดเลือด มีความสำคัญทางคลินิก สามารถที่จะช่วยในการวินิจฉัยโรคได้ ถ้าหากทำด้วยวิธีการที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ ประโยชน์ที่ได้จากการตรวจสอบสเมียร์เลือดนี้ ในปัจจุบันยังเอาไปใช้กันน้อยอยู่ อาจเป็นเพราะความเชื่อถือของแพทย์ต่อผลทางห้องปฏิบัติการยังอยู่ในระดับที่ไม่สูงนัก การควบคุมคุณภาพของการทดสอบจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องนำเข้ามาใช้ในงานประจำวัน เพื่อผลที่ได้จะคุ้มกับการลงทุนที่เสียไป เนื่องจากการทดสอบ การใช้เวลาและการใช้สารเคมี ในการย้อมสเมียร์เลือดเพื่อตรวจสอบสเมียร์เลือด ซึ่งทำอยู่ทั่วไปในโรงพยาบาล

การตรวจสอบสเมียร์เลือด เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องขึ้นอยู่กับคุณภาพของการเก็บตัวอย่างเลือด การทำสเมียร์เลือด การย้อมสี ทิศทางการนับ การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว การกำหนดเกณฑ์การอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดง (Grading of red cell morphology) ที่ถูกต้อง ข้อควรคำนึงในการควบคุมคุณภาพของการตรวจสอบสเมียร์เลือดมีดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อทำสเมียร์เลือดนั้น สามารถเก็บได้ทั้งจากหลอดเลือดดำและหลอดเลือดฝอย จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือด มีความแตกต่างกันเล็กน้อยในระหว่างหลอดเลือดดำ และหลอดเลือดฝอย แต่โดยทั่วไปแล้วไม่มีความสำคัญในการแปลผลทางคลินิก ถ้าการเก็บตัวอย่างเลือด กระทำโดยถูกต้องถูกวิธีการวิธีที่นิยมทำคือเก็บเลือดจากหลอดเลือดฝอย โดยหลีกเลี่ยงการใช้สารกันเลือดแข็ง การเก็บตัว

อย่างเลือดจากหลอดเลือดดำ และใช้สารกันเลือดแข็ง และถ้าทำสเมียร์เลือดอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด ก็สามารถยอมรับได้เช่นเดียวกัน สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งที่แนะนำให้เลือกใช้

1.1 การเจาะเลือดจากหลอดเลือดฝอย

ก. ถอดหมัดของผิวหนัง บริเวณที่จะเจาะเลือดก็มีความสำคัญ กล่าวคือถ้าถอดหมัดของผิวหนังเย็นหรือมี cyanosed capillaries การจะทำให้เลือดไหลออกมาอย่างอิสระนั้น กระทำได้ยาก ควรจะทำให้อุ่นเสียก่อน โดยอาจจะจุ่มนิ้วอุ่นหรือฟองไฟเสียก่อนโดยเฉพาะในฤดูหนาวของทางภาคเหนือของประเทศไทย

* อาจารย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ข. ความลึกของการเจาะ อุปกรณ์ที่นิยมใช้คือ Lancet ชนิดปราศจากเชื้อและใช้ครั้งเดียว (sterile prepacked disposable lancet) จะให้ความลึก 2-3 มม. การเจาะ Lancet ไม่ควรนำไปฆ่าเชื้อแล้วใช้อีก เพราะอาจเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของโรคติดเชื้อของตับ หรือโรคเอดส์ เป็นต้น และอีกประการหนึ่ง ความคมของเข็มจะลดลงอีกด้วย การเจาะที่ไม่ลึก และต้องบีบเค้นให้เลือดออกมานั้นจะทำให้สัดส่วนของเซลล์และน้ำเลือดผิดปกติจากที่เป็นจริง

ค. การลำดับขั้นตอน การทำสเมียร์เลือด หลังจากเขี่ยเลือดหยดแรกทิ้งไปแล้ว หยดที่สองควรจะทำสเมียร์ก่อนแล้วจึงจะทำอย่างอื่น และเมื่อแตะเลือดบนสไลด์แล้ว ควรรีบเกลี่ยทันที มิฉะนั้น เกร็ดเลือดก็จะไปเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่ ทำให้การประมาณจำนวนเกร็ดเลือด และคุณสมบัติของการเกาะกลุ่มผิดปกติไป

1.2 การเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ

ปกตินิยมเจาะ anti-cubital fossa แต่หลอดเลือดดำในส่วนอื่นๆ ของแขนก็สามารถใช้ได้ ในเด็กเล็กนิยมเจาะที่ scalp vein หรือ femoral vein การรัดแขนด้วยสายยางไม่ควรแน่นเกินไป ประมาณความดัน 60 มม. ของปรอท ถ้าใช้วัดความดันของเลือดรัดแขน หรือการรัดแขนนานเกินไป จะทำให้สัดส่วนของเลือดที่เป็นเซลล์กับพลาสมาผิดปกติไป ฉะนั้นก่อนที่จะรัดแขนผู้ป่วยจำเป็นต้องสำรวจความพร้อมเสียก่อน ได้แก่ การเตรียมเข็มเจาะเลือด เสียบัดกับกระบอกฉีดยา และขวดเก็บเลือดจำนวนที่ต้องการ ชนิดของสารกันเลือดแข็ง ให้พร้อมแล้ว จึงลงมือรัดแขน และเจาะเลือดตามลำดับ

สิ่งที่ต้องระมัดระวังอย่างหนึ่งของการเจาะเลือดคือ การป้องกันเลือดแตก (hemolyse) เพราะจะทำให้ การดูรูปร่างของเม็ดเลือดแดง

(red blood cell morphology) ผิดไป ปัจจัยที่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือด ได้แก่

ก. ขนาดของเข็มที่ใช้เจาะเลือด เข็มเจาะเลือด ไม่ควรเล็กเกินไป เพราะจะทำให้เมมเบรนของเม็ดเลือดแดงนิยขาดเม็ดเลือดแดงแตกได้ ตามปกติเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงสามารถทนต่อ shearing stress ได้ในขนาดที่ต่ำกว่า 4000 dynes ต่อตารางเซนติเมตร การใช้เข็มเจาะเลือดที่ขนาดใหญ่มากเกินไป สัดส่วนของการไหลของพลาสมาต่อเซลล์ อาจผิดปกติ ขนาดเข็มที่เหมาะสมให้ใช้คือ เข็มเบอร์ 20 หรือ thin wall เบอร์ 19

ข. แอลกอฮอล์ที่ใช้ เมื่อเช็ดบริเวณผิวหนังที่จะเจาะเลือดด้วยแอลกอฮอล์แล้ว ต้องรอให้แห้งสนิทเสียก่อน มิฉะนั้นแอลกอฮอล์ อาจทำให้เม็ดเลือดแตกได้

ค. กระบอกฉีดยา (Syringe) ที่ใช้ต้องตรวจสอบเสียก่อนว่าแห้งสนิทดี

ง. เมื่อเจาะเลือดเสร็จเรียบร้อยแล้ว อย่าปล่อยออกจากกระบอกโดยผ่านเข็ม ให้ปลดเข็มออกเสียก่อน และค่อยๆ ปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ลงในขวดเก็บเลือด

จ. การผสมกับสารกันเลือดแข็ง ควรผสมแบบคว่ำแล้วทวนกลับกันไปอย่างช้าๆ ไม่ควรเขย่าหรือ กระทำแรงๆ และเร็วๆ จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (Mechanical hemolysis)

2. ผลของสารกันเลือดแข็ง

EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งที่นิยมใช้ในการเก็บเลือดทางโลหิตวิทยา เพื่อการนับและการทำสเมียร์เลือด ไม่นิยมใช้เขปาริน เพราะมักจะทำให้เกิดปัญหาในการย้อมสี เนื่องจากเขปารินรวมตัวกับ basic dye ได้ดีมาก ทำให้สีของสเมียร์เลือดติดสีไปทางน้ำเงิน นอกจากนั้นจะทำให้เกร็ดเลือดจะจับกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่

ผลของ EDTA ต่อสเมียร์เลือด ขึ้นอยู่กับ

ระยะเวลาที่เลือดผสมอยู่กับสารกันเลือดแข็งก่อนทำสเมียร์และขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ EDTA ถ้าใช้ EDTA เพียง 0.44 มก. ก็เพียงพอต่อการจับ (chelate) กับ calcium ion (Ca^{+2}) ในเลือด (whole blood) ของคนปกติ 1 มล. แต่เลือดของคนที่มีภาวะโลหิตจางปริมาณของแคลเซียมต่อเลือด 1 มล. จะสูงกว่าคนปกติ ฉะนั้น ควรใช้ EDTA ความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 0.75 มก. ต่อเลือด 1 มล. การควบคุมคุณภาพของการใช้ EDTA ในสหราชอาณาจักรแนะนำให้ใช้ 1.5 ± 0.25 มก. ของ K_2 EDTA ต่อเลือด 1 มล. ได้มีผู้สังเกตว่าถ้าใช้ tri-potassium salt ของ EDTA จะละลายได้ดีกว่า dipotassium salt และให้ใช้ K_3EDTA 1.2 มก. ต่อเลือด 1 มล. (1)

ในการเตรียมขวดที่เก็บเลือด ที่ใส่สารกันเลือดแข็ง EDTA ถ้าตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จะเป็นก้อนใหญ่ ทำให้อายุของเลือดได้ช้ากว่าการทำเป็น EDTA spray กับหลอดเลือดหรือหมุนกลับไปตามตลอดเวลาจนทำให้แห้งติดผิวแก้ว ความเข้มข้นของ EDTA ต่ำกว่า 4 มก./เลือด 1 มล. ไม่เพียงพอการวัดฮีโมโกลบิน, การนับเม็ดเลือดขาว, การนับเม็ดเลือดแดง, การทำ Hematocrit ผลของ EDTA ต่อเลือดมีดังนี้

2.1 ผลต่อเกร็ดเลือด

ปกติเกร็ดเลือดจะพบมีการจับกลุ่ม (aggregation) บนสเมียร์เลือดที่ได้จากการเจาะเลือดจากหลอดเลือดพอยบริเวรณผิวหนัง ถ้าไม่มีการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดให้เห็น เป็นข้อบ่งชี้ถึงความผิดปกติของการทำงานของเกร็ดเลือด ซึ่งพบได้ในโรค Glanzmann's disease เกร็ดเลือดปกติจะมีขนาดเล็ก (1-5 ไมครอน) และมีแกรนูล และจะพบขนาดใหญ่ได้ในโรค May-Hegglin anomaly และ Bernard Soulier

(giant platelet) syndrome

เกร็ดเลือดใน EDTA blood จะบวม และใหญ่กว่าในสเมียร์เลือดที่ไม่ใส่สารกันเลือดแข็ง อีกประการหนึ่ง EDTA จะไปบดบังกันไม่ให้เกิดมีการจับกลุ่มกัน ฉะนั้นสเมียร์เลือดที่ใช้ EDTA จะไม่สามารถบอกได้ว่า มีความผิดปกติของการทำหน้าที่ และหรือขนาดของเกร็ดเลือดได้ หรือในบางครั้ง แต่โอกาสเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยากมากคือ EDTA ทำให้เกร็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวจับกลุ่มกันได้ บางทีอาจทำให้เห็นเป็นก้อน clump ใหญ่บนสเมียร์เลือดได้ หรืออาจพบ clump ในขวดเลือด ถ้านับจำนวนเกร็ดเลือด จะทำให้ได้ค่าต่ำ แต่ชนิดที่เห็นการเปลี่ยนแปลงได้้น้อยมาก นอกจากนั้น EDTA อาจทำให้เกร็ดเลือดเกิด satellitosis ได้ด้วย

2.2 ผลต่อเม็ดเลือดแดง

ขนาด, รูปร่าง และการติดสีของเม็ดเลือดแดงของสเมียร์เลือด เป็นสิ่งจำเป็นที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคทางคลินิก EDTA สามารถที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ของรูปร่างลักษณะของเม็ดเลือดแดงทำให้เห็นเป็น artifacts ได้ จึงจำเป็นอย่างยี่หระที่จะต้องทำสเมียร์เลือดหลังจากเก็บด้วย EDTA ภายใน 1 ชั่วโมง โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง ไม่จำเป็นที่ต้องใส่ตู้เย็น

การใช้ EDTA ปริมาณน้อยเกินไปทำให้ไม่เพียงพอต่อการจับแคลเซียมออกไซด์หมด ก็สามารถทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้ แม้จะเกิดเพียงบางส่วน (partial clot) จะทำให้ผลของการทดสอบผิดพลาดอย่างมาก ฉะนั้นต้องตรวจสอบก่อนทุกครั้งว่าเลือดที่เก็บมี partial clot หรือไม่ ถ้ามี ก็ไม่ควรทำตัวอย่างเลือดนั้น ให้เจาะเลือดใหม่ทุกครั้ง ดีกว่าทำการทดสอบไปแล้วได้ค่าที่ไม่ถูกต้อง จำนวน EDTA ปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้รูปร่างของเม็ดเลือดแดงผิด

๒. ลักษณะผิดปกติที่พบได้จากการใช้ EDTA blood มีดังนี้

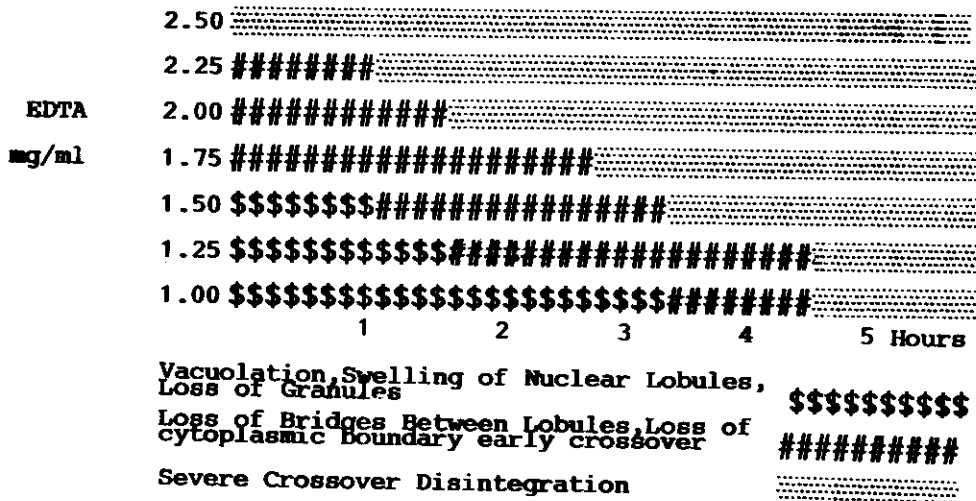
- ก. Spiculated red blood cell
- ข. Target cell
- ค. Rouleaux
- ง. Spherocyte
- จ. Stomatocyte
- ฉ. Punched-out red blood cell

Spiculated red blood cell อาจจะเกิดขึ้น จากผลการเก็บเลือดในขวดที่เป็นด่าง (alkaline medium) ผลของ EDTA ใน alkaline medium อาจทำให้เกิด echinocyte ได้ การทดสอบผลของความเข้มข้นของ EDTA ต่อรูปร่างของเม็ดเลือดแดง โดยเก็บเลือดจำนวน 2, 4, 5 มล. (ขนาดที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบนี้คือ 4 มล. ของเลือด) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าในขวดเลือดที่ใส่เลือดจำนวน 4 หรือ 5 มล. จะพบ rouleaux, spiculated RBC, spheroidal RBC, และ target cell แต่เพียงเล็กน้อย ในขณะที่สเมียร์เลือดจากขวด 2

มล. จะพบ rouleaux, target cell formation และ spiculated RBC อย่างมาก ในเลือดที่เก็บด้วย EDTA จะพบ stomatocyte หรือเม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะคล้ายมีปากตรงกลางได้บ่อย ผลของ EDTA จะทำให้เกิดอาการ anisocytosis, spherocytosis และ macrocytosis ของเม็ดเลือดแดงตามระยะเวลาที่เก็บเลือดทิ้งไว้

2.3 ผลต่อเม็ดเลือดขาว

บ่อยครั้งจากการเก็บเลือดใน EDTA และโกสเมียร์ภายใน 1 ชั่วโมง อาจพบ vacuole ใน monocyte และ granulocyte แต่ใน lymphocyte พบได้น้อยกว่า EDTA blood ที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-30 ชั่วโมง การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว เปลี่ยนแปลงได้เล็กน้อย แต่ถ้านำมาทำสเมียร์เลือดจะเกิด autolysis, vacuolization, degranulation และ PMN จะเกิด hypersegmentation ผลของการเปลี่ยนแปลงของ PMN ต่อจำนวนความเข้มข้นของ EDTA และระยะเวลาที่เก็บ (2) ดังรูป



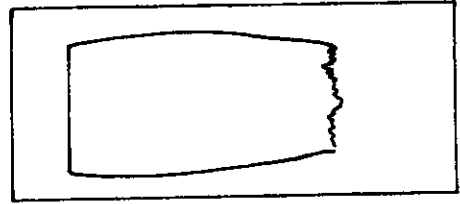
ในระยะแรกของการเปลี่ยนแปลง PMN จะ บวม และเสียคุณสมบัติของโครงสร้างภายใน interlobular bridge จะเสียไปจะเกิด vacuolation ในนิวเคลียส หรือในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ผลของ EDTA ต่อเม็ดเลือดขาวตัวอื่น เช่น mononuclear cell ก็จะเป็นเช่นเดียวกัน

3. การทำแผ่นสเมียร์เลือด

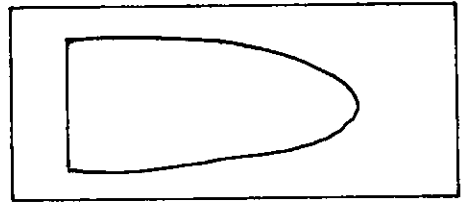
การทำแผ่นสเมียร์ทำได้ทั้งวิธี coverslip และ slide methods แต่ตามห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปนิยมทำบนแผ่นสไลด์ การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว (differential white blood cell count) ให้ถูกต้องนั้น ขึ้นอยู่กับ การกระจายของเลือด ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการโกสเมียร์เป็นอย่างมาก สไลด์ที่นำมาใช้ต้องสะอาด โดยทั่วไปใช้ขนาด 25 มม. x 75 มม. (1 x 3 นิ้ว) หนา 0.8 - 1.2 มม. คนส่วนมากมักจะเข้าใจว่าสไลด์ที่ซื้อมาใหม่สะอาดดีแล้ว แต่เมื่อนำมาใช้สเมียร์เลือด จะทำให้ได้สเมียร์ที่ทำยาก เพราะจะมีไขมันเกาะอยู่ จึงจำเป็นอย่าง ยิงที่จะต้องทำความสะอาดก่อนใช้ทุกครั้ง โดยแช่ใน dichromate cleaning solution นาน 12 - 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปาจนหมด คราบ และแช่ใน ethyl alcohol 95% แล้ว เช็ดให้แห้ง สำหรับสไลด์ที่เคยใช้แล้วนำมาใช้ได้ อีกเหมือนกัน โดยนำมาแช่ใน 3% lysol นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำประปาและต้มในน้ำผงซัก พอก เพื่อกัดสิ่งสกปรก ล้างด้วยน้ำประปาและแช่ใน ethyl alcohol แล้วเช็ดให้แห้ง ถ้าไม่สะอาด อาจแช่ใน dichromate cleaning solution อีกครั้งหนึ่งก็ได้

เลือดสำหรับทำสเมียร์ ไม่ควรเก็บไว้นาน ๕ วัน ควรใช้สเมียร์ภายใน 1 ชั่วโมงหลัง เจาะเลือด การโกสเมียร์ไม่ควรหนาหรือบางเกินไป ซึ่งจะต้องใช้การฝึกฝน ข้อควรคำนึง

การโกสเมียร์ประการหนึ่งคือปลายสุดของสเมียร์ ควรจะตรง (straight) จะทำให้เม็ดเลือดขาวกระจายสม่ำเสมอว่าการโกสเมียร์ ที่ขอบ ปลายมน (bullet shaped)



straight-edged smear



bullet shaped smear

การทำให้ขอบปลายตรงนั้น สามารถทำได้ โดยใช้ตัวโก (spreader) ที่ขนาดความกว้าง น้อยกว่าความกว้างของสไลด์ หรือใช้ cover slip เป็นตัวโก ซึ่งข้อดีของ cover slip คือ จะให้ขอบปลายตรง และใช้โกได้ทกอันไม่ต้อง เลือกเหมือนสไลด์ที่มักมีขอบปลายไม่เรียบ แต่ข้อ เสียคือแพงง่าย

การทำแผ่นฟิล์มควรยาวอย่างน้อย 2.5 ซม. และปลายสุดของฟิล์ม ห่างจากปลายขอบ สไลด์ 1 ซม. เมื่อโกเสร็จควรทำให้แห้งเร็ว ถ้าช้าจะเกิด "punched out" ได้ ไม่ควรใช้ ความร้อนช่วย เนื่องจากจะทำให้เซลล์เหี่ยว (shrink) ได้ และควรย้อมด้วยเร็ว ถ้าสไลด์ เก็บไว้นานหลายเดือน แล้วนำมาย้อมจะทำให้ตัด เป็นสีน้ำเงินได้

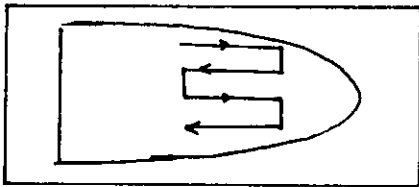
4. การย้อมสี

การย้อมสีส่วนใหญ่ นิยมย้อมแผ่นสเมียร์ด้วย Wright's stain หรือ Wright-Giemsa's

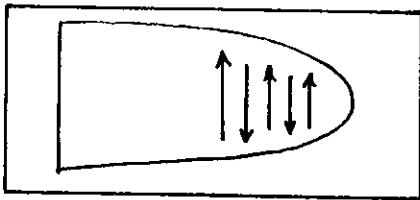
stain ซึ่งเป็นสีที่จัดอยู่ในประเภท Romanowsky dyes ซึ่งประกอบด้วย anionic dye eosin และ cationic methylene blue การเตรียมสี จะต้องเตรียมให้ได้ตามมาตรฐาน และมีการตรวจสอบก่อนนำไปใช้ เช่นเดียวกับ pH ของ buffer ก็มีความสำคัญสำหรับการย้อม เช่นเดียวกัน

5. ทิศทางของการนับ

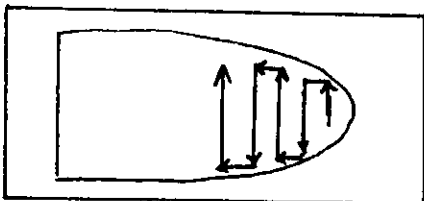
ทิศทางของการนับแยกชนิด ของเม็ดเลือดขาว จากสไลด์บนแผ่นฟิล์มที่ย้อมสีดีแล้วนั้น ปกติมีทิศทางการนับอยู่ 3 แบบคือ การนับตามแนวยาว แนวขวาง และสลับกันคล้ายฟันปลา ดังรูป



ทิศทางการนับตามแนวยาว



ทิศทางการนับตามแนวขวาง



ทิศทางการนับสลับกันคล้ายฟันปลา

ทิศทางของการนับซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันคือแบบที่ 3 โดยจะเลือกทิศทางของการนับจากส่วนบางของปลายสไลด์ ตรงบริเวณที่เม็ด

เลือดเรียงตัวกันอย่างสม่ำเสมอ และทิศทางการนับสลับกันคล้ายฟันปลา ทำให้สามารถศึกษาเม็ดเลือดได้ทั่วถึง และยังเป็น การป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดซ้ำเม็ดกันอีกด้วย

6. การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว

การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว มีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้ง่าย สิ่งที่จะต้องคำนึงถึงในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ได้แก่

6.1. คน ในที่นี้หมายถึงผู้ซึ่งรับผิดชอบงานในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ซึ่งผู้ที่ทำหน้าที่นี้ อย่างน้อยที่สุดจะต้องมีความรับผิดชอบ และเห็นความสำคัญของงานที่ตนเองรับผิดชอบอยู่มากพอสมควร

6.2. ความรู้ของคน นอกจากจะต้องมีความรับผิดชอบ และเห็นความสำคัญของงานที่ตนเองรับผิดชอบอยู่นั้น ระดับความรู้ของคนก็เป็นสิ่งสำคัญมากอย่างหนึ่ง ผู้ที่รับผิดชอบในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ควรจะทราบถึงรายละเอียดของหลักฐาน, ชนิดของเม็ดเลือด ทั้งชนิดที่ปกติและผิดปกติ ถึงลักษณะที่ผิดปกติอื่นๆ ที่สามารถบอกได้ ในขณะที่ทำการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวด้วย

6.3. ความละเอียดและรอบคอบ ในที่นี้หมายถึงถึงความละเอียดรอบคอบในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวและความละเอียดรอบคอบในด้านต่างๆ เช่น หยิบสไลด์ให้ถูกต้อง, ทำตามขั้นตอนต่างๆ ให้ถูกต้อง

6.4. กล้องจุลทรรศน์ เป็นอุปกรณ์สำคัญมากที่สุด ในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ดังนั้น จึงควรดูแลเอาใจใส่รักษาทำความสะอาดให้อยู่ในสภาพที่เตรียมพร้อม สำหรับการใช้งาน ได้ตลอดเวลา และควรตรวจสอบหัวเลนส์อยู่เป็นประจำและทำความสะอาดทุกวัน

ในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวนั้น ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง และผู้ปฏิบัติการแต่ละคน

จะใช้หัวเลนส์กำลังขยาย 100x หรือ 40x ก็แล้วแต่ดุลยพินิจของแต่ละคน และแต่ละห้องปฏิบัติการ อันสืบเนื่องมาจากคน, ความรู้ของคน, ความละเอียดรอบคอบในการปฏิบัติงาน เพราะในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว โดยใช้หัวเลนส์กำลังขยาย 40x ถ้าเป็นผู้ที่มีความรู้ ความชำนาญ และมีประสบการณ์มาก ก็สามารถที่จะนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวออกได้ด้วยกำลังขยายดังกล่าว แต่ในกรณีที่ต้องการรายละเอียดอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของเม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงบางอย่าง ต้องใช้กำลังขยาย 100x หรือ oil immersion lens เท่านั้น ซึ่งการดูด้วยกำลังขยาย 40x จะทำให้คุณภาพด้อยลงไปเฉพาะแต่เพียงเพื่อใช้ในการดูคร่าวๆ เท่านั้น และใช้กำลังขยาย 100x ทำการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวต่อไป

7. การให้เกณฑ์ การอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดง

การอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดงทั้งชนิดที่ปกติและผิดปกตินั้น ต้องมีเกณฑ์เพื่อเป็นมาตรฐานในการอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดงให้เหมือนกันทุกห้องปฏิบัติการ ซึ่งโดยปกติแล้วหากผู้ที่รับผิดชอบมีความชำนาญหรือมีประสบการณ์ในการทำมานานพอสมควร จะสามารถตรวจรูปร่างเม็ดเลือดแดงควบคู่กันไปกับการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวได้ เกณฑ์ในการอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดงมีดังนี้

7.1 ลักษณะการติดสีของเม็ดเลือดแดง

ค่าติดสีจาง (hypochromia) กว่าปกติหรือไม่ ซึ่งลักษณะการติดสีจาง จะสังเกตได้จากบริเวณขอบของเซลล์ ซึ่งติดสีชมพูแดงแคบลงกว่าปกติ โดยให้เปรียบเทียบกับ การติดสีของเม็ดเลือดแดงปกติในบริเวณใกล้เคียงกัน การให้เกณฑ์ของ hypochromia มีดังนี้

1+ hypochromia : ที่ขอบของเม็ดเลือดแดง

ติดสีลดลงไป 1 ใน 4 ของการติดสีตามปกติ
2+ hypochromia : ที่ขอบของเม็ดเลือดแดงติดสีลดลงไปครึ่งหนึ่งของการติดสีตามปกติ
3+ hypochromia : ที่ขอบของเม็ดเลือดแดงติดสีลดลงไป 3 ใน 4 ของการติดสีตามปกติ
4+ hypochromia : ที่ขอบเม็ดเลือดแดงติดสีลดลงมากจนเห็นเพียงเส้นบางๆ เรียกชื่ออีกอย่างว่า leptocyte

ต่อไปให้ประมาณจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดสีจางตามเกณฑ์ดังกล่าว ว่าเป็นอัตราส่วนร้อยละเท่าใดของเม็ดเลือดแดงในแต่ละ field (population) แล้วรายงานผล ตัวอย่างเช่น 3+ hypochromia in 20% population of red cell เป็นต้น

7.2 ลักษณะของรูปร่างของเม็ดเลือดแดง
เม็ดเลือดแดงปกติมีรูปร่างเป็น biconcave แต่หากเม็ดเลือดแดงมีรูปร่างผิดปกติเรียกว่า poikilocyte ซึ่งได้แก่ spherocyte, schistocytes, ovalocytes, elliptocytes, target cells, tear drop cells, acanthocytes, sickle cells, stomatocytes, echinocytes และ burr cells ถ้าตรวจพบ poikilocytes มากกว่า 5% ของ population ของเม็ดเลือดแดง ให้รายงานรายละเอียดของแต่ละชนิดของ poikilocyte นั้นว่ามีชนิดละกี่ % ของ population แต่ถ้ามีน้อยกว่า 50% ของ population ก็ให้บอกเพียงแต่ว่ามี poikilocyte กี่ % เท่านั้น

เกณฑ์ของการรายงาน poikilocytosis มีดังนี้

1+ poikilocytosis : มี poikilocyte 2-6 cells/oil field

2+ poikilocytosis : มี poikilocyte 7-10 cells/oil field

3+ poikilocytosis : มี poikilocyte

11-20 cells/oil field

4+ poikilocytosis : มี poikilocyte มากกว่า 21 cells/oil field

7.3 ขนาดของเม็ดเลือดแดง เม็ด

เลือดแดงปกติมีขนาดประมาณ 7.2 ไมครอน เม็ดเลือดแดงที่มีขนาดผิดปกติเรียกว่า anisocytosis ซึ่งอาจเป็นมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (macrocytes) ขนาดเล็กกว่าปกติ (microcyte) การรายงานให้สังเกตเม็ดเลือดแดงขนาดปกติที่ปรากฏให้เห็นเป็นหลัก

เกณฑ์ของการรายงาน anisocytosis มีดังนี้

1+ anisocytosis : มีเม็ดเลือดแดงขนาดผิดปกติ = 4-8 cells/oil field

2+ anisocytosis : มีเม็ดเลือดแดงขนาดผิดปกติ = 9-14 cells/oil field

3+ anisocytosis : มีเม็ดเลือดแดงขนาดผิดปกติ = 15-25 cells/oil field

2+ anisocytosis : มีเม็ดเลือดแดงขนาดผิดปกติมากกว่า 25 cells/oil field

งานห้องปฏิบัติการ ที่สามารถทำการนับเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่อง electronic count อาจรายงานความผิดปกติของขนาดเม็ดเลือดแดงควบคู่ไปกับค่าของ red cell indices คือ Mean corpuscular volume (MCV)

หากตรวจพบภาวะ macrocytosis คือ มีปริมาณของ macrocytes มากกว่า 50% ของเม็ดเลือดแดง ให้เพิ่มเติมรายละเอียดในการรายงาน เพื่อให้เห็นถึงขนาดที่ใหญ่ขึ้นกว่าปกติ ดังนี้

1+ macrocytosis : รายงานเมื่อ MCV 98-105 fl

2+ macrocytosis : รายงานเมื่อ MCV 106-111 fl

3+ macrocytosis : รายงานเมื่อ MCV

112-120 fl

4+ macrocytosis : รายงานเมื่อ MCV มากกว่า 121 fl

ในการที่ตรวจพบเม็ดเลือดแดงชนิด polychromasia หรือ polychromatophilic red cell ร่วมไปกับ macrocytes เช่นมี macrocytes 20% ของ population ด้วยก็รายงานว่า 4+ polychromasia and 20% macrocytes

หากตรวจพบภาวะ microcytosis คือ มีปริมาณ microcytes มากกว่า 50% ของเม็ดเลือดแดง ให้เพิ่มเติมการรายงาน เพื่อให้เห็นถึงขนาดที่เล็กกว่าปกติ ดังนี้

1+ microcytosis : MCV 75-83 fl

2+ microcytosis : MCV 70-74 fl

3+ microcytosis : MCV 64-69 fl

4+ microcytosis : MCV น้อยกว่า 64 fl

ในการที่พบ microcyte ส่วนใหญ่เป็น microspherocyte ให้รายงานจำนวน % ของ microspherocyte ที่พบได้เลยทันที เช่น microspherocyte 60%

7.4 Red cell inclusion ภาวะที่ภายในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงปรากฏสิ่งแปลกปลอม (inclusion) ให้เห็นเป็นก้อนอาจจะเป็นเกล็ดหรือเป็นท่อนๆ ซึ่งสามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีย้อมน้ำได้แก่ basophilic stippling, Howell-Jolly body ซึ่งมีเกณฑ์การรายงานดังนี้

Occasional : พบโดยเฉลี่ย 1 cell/oil field หรือน้อยกว่า

moderate : พบโดยเฉลี่ย 2-4 cells /oil field

many : พบโดยเฉลี่ย 5 cells/oil field

ในการที่พบ malarial pigments หรือ

Cabot's ring ไม่ว่าจะพบมากหรือน้อยเพียงไร ให้รายงานว่ามี malarial pigment หรือพบ Cabot's ring เสมอ

8. บทส่งท้าย

การทำ internal quality control ของการตรวจ blood smear นี้จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการเก็บเลือด การไลสเมียร์ การย้อมสี การดูลักษณะรูปร่าง การนับจำนวน ฯลฯ เป็นต้นให้ถูกต้อง เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดความผิดพลาด ซึ่งเป็นการกันไว้ดีกว่าแก้ การทำ internal QC ไปด้วย preventive program นี้ จะช่วยงานการตรวจสเมียร์เลือดมีคุณภาพเพิ่มขึ้น หรือรักษาคุณภาพให้ด้อยลงไป นอกจากนั้น

เราควรจะได้มีการตรวจสอบย้อนหลังดูบ้างทั้งที่ปกติและผิดปกติ ว่าที่เราเคยรายงานไปแล้วถ้ามาดูใหม่อีกครั้งหนึ่งจะเหมือนเดิมหรือไม่ หากได้ปฏิบัติด้วยความระมัดระวัง และมีจิตสำนึกเรื่องคุณภาพแล้ว คิดว่างานพัฒนาคุณภาพในทางโลหิตวิทยา จะพัฒนาขึ้นได้เป็นอย่างมาก

เอกสารอ้างอิง

1. Lewis SM, Coster JF. In "Quality Control in Haematology". Academic Press, 1975.
2. Cavit I. In "Method in Hematology". Quality Control, Churchill Livingstone, 1982.

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่