

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาชุดน้ำยาตรวจนับ Reticulocytes, Fetal Cells และ Malarial Infected Red Cells โดยวิธี Flow Cytometry

ยุทธาน หมั่นดี^{1*}, จิราวรรณ กัณหาสูตร¹, วรรณธรณ ฤทธิรงค์¹, ดารารัตน์ แด่นไกล¹, อังคณา แซ่เจ็ง²
และ จตุพร พรศิลป์พิพัฒน์³

บทคัดย่อ

Flow cytometry คือ การตรวจนับเซลล์เป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้น ที่มีความน่าเชื่อถือสูง reticulocytes (Retic) คือ เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไม่มี nucleus แต่มี ribonucleic acid (RNA) ในงานประจำวัน นับด้วยวิธี supravital stain, fetal cells (F-cells) คือ เม็ดเลือดแดงที่มี fetal hemoglobin (HbF) บรรจุอยู่ในงานประจำวันนับด้วยวิธี acid elution test, malarial infected red cells (M-cells) คือ เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ มาลาเรีย ในงานประจำวันนับด้วยวิธี Giemsa stain บนแผ่นฟิล์มเลือดหนาและบาง การตรวจในงานประจำวันทั้ง 3 ชนิดนี้มีความน่าเชื่อถือไม่คงที่ เนื่องจากการใช้กล้องจุลทรรศน์ในการตรวจนับ จึงขึ้นอยู่กับ ความรู้และความชำนาญของผู้ตรวจ แต่วิธี flow cytometry ตรวจนับด้วยเครื่องน่าเชื่อถือ และง่ายกว่า เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจนับและผลิตชุดน้ำยาตรวจนับเซลล์ดังกล่าวด้วยวิธี flow cytometry เปรียบเทียบกับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ และวิธีการที่ใช้ในงานประจำวัน โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่ทราบระดับของเซลล์แต่ละชนิดแล้ว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมใน Retic count คือ fix ด้วย 0.05% glutaraldehyde (glu), room temperature (RT), 10 นาที; permeabilize (perm) ด้วย 0.05% triton X-100 (TX), RT, 10 นาที; ย้อมด้วย 0.2 µg/mL acridine orange (AO) หรือ 1 µg/mL thiazole orange (TO), RT, 30 นาที ในที่มืด ส่วน F-cell count คือ fix ด้วย 0.05% glu, RT, 10 นาที; perm ด้วย 0.1% TX, RT, 10 นาที; ย้อมด้วย monoclonal antibody ต่อ HbF (MoAb-HbF) ที่ติดฉลาก fluorescein isothiocyanate (FITC) หรือ rhodamine phycoerythrin (RPE), RT, 30 นาที ในที่มืด และ M-cell count คือ fix ด้วย 0.25% glu, RT, 30 นาที; perm ด้วย 0.25% TX, RT, 5 นาที; ย้อมด้วย MoAb ต่อ glycophorin A ที่ติดฉลาก RPE, RT, 30 นาที ในที่มืด แล้วย้อมต่อด้วย 0.2 µg/mL AO หรือ 1 µg/mL propidium iodide (PI) หรือ 10 µg/mL TO ที่ RT, 30 นาที ในที่มืด ตรวจนับร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกด้วยเครื่อง flow cytometer จากบริษัท Becton Dickinson รุ่น FACScalibur ผลการเปรียบเทียบกับน้ำยาจากต่างประเทศและวิธีที่ใช้ในงานประจำวัน พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี และค่าเฉลี่ยของแต่ละวิธีไม่แตกต่างกัน สำหรับ M-cells ที่การตรวจด้วย flow cytometry สามารถแยกผู้ป่วยกับคนปกติออกจากกันได้ และให้ค่าสัมพันธ์กับวิธีที่ใช้ในงานประจำวัน โดยสรุป วิธีการตรวจและน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้มีคุณภาพทัดเทียมกับที่นำเข้าจากต่างประเทศ และผลการตรวจใกล้เคียงกับวิธีที่ใช้ในงานประจำวัน จึงแนะนำให้ใช้วิธีการและน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นมานี้ เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือให้สูงขึ้น โดยที่ M-cell count ยังสามารถที่จะพัฒนาคุณภาพน้ำยาตรวจให้สูงขึ้น ไปได้อีก โดยการใช้ RNase ย่อยสลาย RNA เพื่อลดสัญญาณรบกวนจาก Reticulocytes ก่อนนำมาใช้ในงานประจำวัน วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2547; 38: 81-94.

คำรหัส : โพลีไซโตเมตริ รีติคูลocytes ฟีตลเซลล์ เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย ชุดน้ำยาตรวจ

* งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการนุเคราะห์สำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (IPUS) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

¹ แขนงจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

² กลุ่มโรคติดต่อมาโดยแมลง (ศูนย์มาลาเรีย) สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 เชียงใหม่ 50200

³ บริษัท แปซิฟิก ไบโอเทค จำกัด เลขที่ 6 ถนนวิวัฒนา 3 ลาดพร้าว 110 บางกะปิ กรุงเทพฯ 10310

* ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: yuttana@chiangmai.ac.th หรือ myuttana@hotmail.com

Abstract : Development of Reagent Kits for Enumeration of Reticulocytes, Fetal Cells and Malarial Infected Red Cells by Flow Cytometry

Yuttana Mundee¹, Jirawan Kantasuit¹, Kantaros Keyoonwong¹, Dararat Dankai¹, Aungkana Saejeng² and Jaturaporn Pornsilapatip³

Flow cytometry (FC) is a procedure for enumeration of cells with high number and reliability. Reticulocytes (Retic) are immature erythrocytes without nucleus but contain ribonucleic acid (RNA). They can be counted in routine work by supravital stain. Fetal cells (F-cells) are erythrocytes containing fetal hemoglobin (HbF). They can be counted in routine work by acid elution test. Malarial infected red cells (M-cells) are erythrocytes containing malarial parasites. They can be counted in routine work by Giemsa stain on thick or thin blood films. Due to their microscopic examination, these routine tests are vary in reliability, subjective and depended on experience and expertise of examiners. Flow cytometry is objective, rapid and more reliable. To determine optimal conditions, prepare reagent kits for these cell counts and compare with commercial test kits and routine procedures were objectives. Blood samples with known data of these cell counts were used for setting up and comparison. The optimal conditions for Retic count were fixed with 0.05% glutaraldehyde (glu), at room temperature (RT), for 10 minutes (min); permeabilized (perm) with 0.05% triton X-100 (TX), RT, 10 min; stain with 0.2 µg/mL acridine orange (AO) or 1 µg/mL thiazole orange (TO), in the dark, RT, 30 min. The conditions for F-cell count were fixed with 0.05% glu, RT, 10 min; perm with 0.1% TX, RT, 10 min; stained with monoclonal antibody to HbF (MoAb-HbF) conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC) or rhodamine phycoerythrin (RPE), in the dark, RT, 30 min. The conditions for M-cell count were fixed with 0.25% glu, RT, 30 min; perm with 0.25% TX, RT, 5 min; stained with MoAb to glycopholin A (GPA) conjugated RPE, in the dark, RT, 30 min; double stained with either 0.2 µg/mL AO or 1 µg/mL propidium iodide (PI) or 10 µg/mL TO, in the dark, RT, 30 min. These were then counted for %positive of each cells by flow cytometer (Becton Dickinson, model FACScalibur). The comparison results showed good correlation and the mean % positive were not significantly different among these procedures. For M-cell count procedure, the results can discriminate between normal subjects and patients with malarial infection and correlate well with the routine test. In conclusion, these new developed procedures and reagent kits had high quality equal to the commercial kits and gave similar results as the routine tests. We recommend to use these developed reagent kits for more reliability. For the M-cell count, its quality can be improved, by RNase treatment to degrade RNA and reduce noise from reticulocytes, before implementation for routine testing. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2005; 38: 81-94.

Key words : Flow cytometry, reticulocytes, fetal cells, malarial infected red cells, reagent kits

* This study was supported by Industrial Project for Undergraduate Student (IPUS), Thailand Research Fund (TRF), 2002

¹ Section on Clinical Microscopy, Department of Associated Medical Sciences Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University 50200, Thailand.

² Vector Born Disease Group (Malaria Center), Center for Disease Prevention and Control Region 10, Chiangmai 50200, Thailand.

³ Pacific Biotech Co. Ltd., No. 6 Sonthiwattana 3, Ladprao 110, Bangkok, Bangkok 10310, Thailand.

* Correspondent E-mail: yuttana@chiangmai.ac.th or myuttana@hotmail.com

1. บทนำ

1.1 Flow Cytometry คือ เทคนิคการตรวจนับ และวัดคุณสมบัติจำเพาะของเซลล์อิสระที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวและถูกดันให้ไหลเป็นแถวเรียงเดี่ยวผ่านลำแสง ซึ่งนิยมใช้แสงเลเซอร์ การใช้ flow cytometry มีข้อดีเหนือกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์ คือ สามารถตรวจเซลล์เป็นจำนวนมากได้ภายในเวลารวดเร็ว ให้ผลแน่นอน น่าเชื่อถือมากกว่า¹⁻³

1.2 ความสำคัญและการตรวจนับ reticulocytes, fetal cells และ malarial infected red cells

1.2.1 Reticulocytes (Retic) คือ เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไม่มี nucleus แต่ยังคงมี ribonucleic acid (RNA) เหลืออยู่ โดยจะถูกผลิต ออกมาจากไขกระดูก (bone marrow) มากกว่า ปกติเมื่อมีภาวะโลหิตจาง ซึ่งบ่งชี้ว่าไขกระดูกทำงานได้ดี การตรวจนับ Retic จึงมีความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยและตรวจติดตามการรักษาภาวะโลหิตจางและความผิดปกติของไขกระดูก

1.2.2 การตรวจนับ Retics อาศัยการ ย้อม RNA ด้วยสี supravital stains ซึ่งจะทำให้ RNA ตกตะกอนเป็นเม็ดเล็กๆ เรียงกันเป็นเส้นสาย ติดสีน้ำเงินอมม่วง สามารถตรวจนับได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ รายงานเป็นร้อยละ วิธีนี้มีข้อเสีย คือ ความถูกต้องแม่นยำไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับความรู้และความชำนาญของผู้ตรวจ จึงได้มีการใช้สีเรืองแสง เช่น acridine orange (AO) และ thiazole orange (TO) เป็นต้น ย้อม RNA ซึ่งสามารถตรวจนับได้ด้วยวิธี flow cytometry ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง^{4,5}

1.2.3 Fetal cells (F-cells) คือ เม็ดเลือดแดงที่มี fetal hemoglobin (HbF) อยู่ภายใน ซึ่งจะถูกผลิตออกมามากกว่าปกติใน โรคธาลัสซีเมีย และโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของ hemoglobin (Hb) จึงใช้การตรวจนับจำนวน F-cells ร่วมกับการตรวจชนิดอื่นๆ จำแนกชนิดย่อยของโรค thalassemia ได้

1.2.4 การตรวจนับ F-cells ใช้วิธี acid elution test จากการที่ HbF ทนกรดจึงยังคงอยู่ แต่ Hb ชนิดอื่นๆ ไม่ทนกรดจึงหลุดออกไปเมื่อถูกแช่ในสารละลายกรด เมื่อย้อมด้วยสี amido black B หรือ eosin จะพบ F-cells ติดสี โดยที่เม็ดเลือดแดง ปกติไม่ติดสี ตรวจนับด้วย

กล้องจุลทรรศน์ รายงานเป็นร้อยละ ซึ่งมีข้อด้อยดังได้กล่าวไปแล้ว จึงมีการย้อม HbF ใน F-cells ด้วย monoclonal antibody (MoAb) ที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง เช่น fluorescein isothiocyanate (FITC: สีเขียว) หรือ rhodamine phycoerythrin (RPE: สีแดง) ซึ่งมีคุณสมบัติจับ ติดแน่นกับ HbF แล้วใช้วิธี flow cytometry ตรวจนับได้^{6,8}

1.2.5 M-cells คือ เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ หรือมีเชื้อ malaria อยู่ในเซลล์ ซึ่งเชื้อที่ก่อโรคมalaria เรื้อรังในมนุษย์มี 4 species คือ Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae และ P. ovale ดังนั้นการตรวจหาและนับ เพื่อการวินิจฉัยโรคนี้ จึงต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้และความชำนาญสูง

1.2.6 การตรวจนับ M-cells ใช้การย้อมสี Giemsa stain บนแผ่นฟิล์มเลือดทั้งชนิดหนา และชนิดบาง แล้วตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่มีข้อด้อยดังได้กล่าวไปแล้ว จากการที่ M-cells มีสารพันธุกรรมของเชื้อที่เป็น deoxyribonucleic acid (DNA) อยู่ภายใน ในขณะที่เม็ดเลือดแดงตามปกติไม่มี การย้อม malarial DNA ด้วยสีเรืองแสง เช่น acridine orange (AO), propidium iodide (PI) และ thiazole orange (TO) เป็นต้น ร่วมกับการย้อม glycophorin A (GPA) ซึ่งพบเฉพาะบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วย MoAb ต่อ GPA ที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง FITC หรือ RPE เพื่อแยกเม็ดเลือดแดงออกจากเม็ดเลือดขาว จากนั้นจึงใช้วิธี flow cytometry ในการตรวจนับ ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีเหนือกว่าการตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์^{9,10}

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและผลิตชุดน้ำยาตรวจนับ reticulocytes (Retic) ด้วยวิธี flow cytometry¹¹⁻¹³

1.3.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและผลิตชุดน้ำยา ตรวจนับ fetal cells (F-cells) ด้วยวิธี flow cytometry^{14,15}

1.3.3 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและผลิตชุดน้ำยาตรวจนับ Malarial infected red cells (M-cells) ด้วยวิธี flow cytometry⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

2. วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 Reticulocyte count

2.1.1 ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่มีค่า reticulocytes สูงๆ

ตัวอย่างเลือดปกติ 5 ราย

ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคโลหิตจาง 5 ราย

ตัวอย่างเลือดจากเด็กแรกคลอด 5 ราย

ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย thalassemia 5 ราย

2.1.3 วิธีการตรวจนับ reticulocytes ด้วย flow cytometry

วิธีการหาสภาวะที่เหมาะสม ใช้วิธี ที่ได้จากรายงานของ Chin-Yee¹¹ เป็นต้นแบบ โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมทีละขั้นตอน ตั้งแต่ fixation, permeabilization และ staining ดังนี้

Fixation

- หาความเข้มข้นของ glutaraldehyde ที่เหมาะสม เปรียบเทียบ 5 ระดับ คือ 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 และ 0.0125% ใน phosphate buffer saline (PBS)

- หาอุณหภูมิการ fix ที่เหมาะสม เปรียบเทียบ 2 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง (RT) และ 4°C

- หาระยะเวลาการ fix ที่เหมาะสม เปรียบเทียบ 5 ระดับ คือ 2.5, 5, 10, 20 และ 40 นาที

Permeabilization

- หาความเข้มข้นของ triton X-100 ที่เหมาะสม เปรียบเทียบ 5 ระดับ คือ 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 และ 0.0125% ใน PBS

- หาอุณหภูมิการ permeabilize ที่เหมาะสม เปรียบเทียบอุณหภูมิ 2 ระดับ คือ RT และ 4°C

- หาระยะเวลาการ permeabilize ที่เหมาะสม เปรียบเทียบ 5 ระดับ คือ 2.5, 5, 10, 20 และ 40 นาที

Staining

- หาความเข้มข้นของ สี AO และ TO ที่เหมาะสม เปรียบเทียบความเข้มข้นสี AO 5 ระดับ คือ 2, 0.2, 0.02, 0.002 และ 0.0002 µg/mL และ ความเข้มข้นสี TO 5 สภาวะ คือ 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 µg/mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย เครื่อง flow cytometer

- หาอุณหภูมิการ stain ที่เหมาะสม เปรียบเทียบ 2 ระดับ คือ RT และ 4°C

- หาระยะเวลาการ stain ที่เหมาะสมเปรียบเทียบ เวลา 5 ระดับ คือ 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที

- เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดได้แล้ว จึงทำการเตรียมชุดน้ำยาดตรวจ Retic-Count Kit เปรียบเทียบวิธีที่หาได้นี้กับวิธีการอื่นๆ ดังนี้

Dry method

- ผสมเลือดกับสี new methylene blue อัตราส่วน 1:1

- เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

- หยดลงบน slide แล้วทำ smear บางๆ 1 แผ่น

- ทิ้งไว้ให้แห้ง ตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์

Wet method

- ผสมเลือดกับสี new methylene blue อัตราส่วน 1:1 บนแผ่น slide

- ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

- ใช้ cover glass ปิดทับ แล้วตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์

Hemacytometer method

- ผสมเลือดกับสี new methylene blue อัตราส่วน 1:1

- ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

- ใช้ red pipette ดูดส่วนผสมที่ได้ ขึ้นมาถึงขีด 1.0 แล้วดูด PBS ขึ้นมาอีกจนถึงขีด 101 เขย่าให้เข้ากัน

- นำมาหยดลงบน hemacytometer ให้เต็มทั้ง 2 ด้าน

- ตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์

เปรียบเทียบ reproducibility โดยการทำ within-run coefficient of variation (OCV) และ between-run CV (RCV) อย่างละ 10 ค่า โดยวิธี การทั้งหมด เปรียบเทียบกันในตัวอย่างเป็นเลือด 20 ตัวอย่าง

2.2 F-Cell Count

2.2.1 ตัวอย่างเลือด

เลือดที่มีค่า F-cell สูง 1 ราย

เลือดคนปกติ 4 ราย

เลือดผู้ป่วยโรคโลหิตจาง 4 ราย

เลือดผู้ป่วย thalassemia 8 ราย

เลือดเด็กแรกคลอด 4 ราย

2.2.2 วิธีการทดลอง

Acid Elution Test ใช้วิธีการของ Sanguan sermsri⁽⁸⁾ ดังนี้

- Smear เลือดบางๆ บนแผ่น slide ทิ้งไว้ให้แห้ง
- แช่ใน 75% ethyl alcohol 2 นาที
- แช่ต่อใน 0.1% amido black B in 75% ethyl alcohol pH 1.6 นาน 2 นาที พอดี
- ล้างน้ำแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
- ตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์รายงาน เป็นร้อยละ

Alkaline Denaturation⁽⁵⁾

- นำเลือดมาปั่นที่ 2,000 g 10 นาที
- ดูด plasma ทิ้งล้าง pack red cell (PRC) 3 ครั้ง ด้วย PBS
- ผสม PRC 100 μ L กับน้ำกลั่น 200 μ L
- เติม Drabkin solution 1.3 μ L เมื่อครบ 5 นาที แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 700 μ L
- หลอดแรกเติม NaOH 50 μ L (test) หลอดที่สอง เติมน้ำกลั่น 50 μ L (reference) เขย่าให้เข้ากัน
- เมื่อครบ 2 นาทีพอดีเติม ammonium sulfate แล้วเขย่าอย่างรวดเร็ว 5 นาที เพื่อให้จับกันเป็นตะกอน
- บั่นที่ 12,000 rpm 10 นาที โดยไม่ใช้ break
- ดูด supernatant มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm โดย dilute หลอด reference ด้วย น้ำกลั่น 1 ต่อ 20

การคำนวณ

$$\%HbF = \frac{At \times 100}{Ar \times 20}$$

At = ค่าการดูดกลืนแสงของ test

Ar = ค่าการดูดกลืนแสงของ reference

$$\%HbF/F\text{-cells} = \frac{MCH \times \%HbF}{\%F\text{-cells}}$$

MCH = mean cell hemoglobin ได้จากเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ

%HbF = ร้อยละของ HbF ใน total Hb ได้จาก alkaline denaturation test

%F-cells = ร้อยละของ F-cells ใน total RBC ได้จาก acid elution แบบ dry smear

การหาสภาวะที่เหมาะสมวิธี Flow Cytometry^(14,15)

Fixation

- ใช้ glutaraldehyde ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 และ 0.0125% ใน PBS
- ที่อุณหภูมิ on ice และ RT
- ระยะเวลา 2.5, 5, 10, 20 และ 30 นาที

Permeabilization

- ใช้ triton X-100 ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 และ 0.0125% ใน 0.1% BSA-PBS
- ที่อุณหภูมิ on ice และ RT
- ระยะเวลา 2.5, 5, 10, 20 และ 30 นาที

Stain

- ใช้ MoAb-HbF ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16
- ที่อุณหภูมิ on ice และ RT
- เวลา 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที

Enumeration

- เติม 1% formaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS 500 mL
- นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer
- เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดได้แล้ว จึงทำการเตรียมชุดน้ำยาตรวจ F-cell Count Kit เปรียบเทียบวิธีที่หาได้นี้กับวิธีการอื่นๆ

เปรียบเทียบ reproducibility โดยการทำ within-run coefficient of variation (OCV) และ between-run CV (RCV) อย่างละ 10 ค่า โดยวิธีการทั้งหมด เปรียบเทียบกันในตัวอย่างเป็น 20 ตัวอย่าง

2.3 M-Cell Count

2.3.1 ตัวอย่างเลือด

Positive samples คือ ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย ที่มีอาการไข้และตรวจพบเชื้อมาลาเรีย ด้วยวิธี thick blood film จำนวน 11 ราย

Negative samples คือ ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ไม่มีอาการไข้แต่ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรีย ด้วยวิธี thick blood film จำนวน 20 ราย

Normal samples คือ ตัวอย่างเลือดของคนปกติที่ไม่เคยติดเชื้อมาลาเรียมาก่อน จำนวน 11 ราย

2.3.2 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี

Giemsa Stain⁹

- Smear เลือดลงบน slide ทำเป็น thick film ขนาด 1 cm^2 1 แผ่น
- Smear เลือดลงบน slide ทำเป็น thin film 1 แผ่น
- Fix thin film ด้วย methanol รอให้แห้ง ส่วน thick film ไม่ต้อง fix
- ย้อมสี Giemsa 10 นาที ล้างน้ำหรือ buffer ปลอຍให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจฟิล์มเลือด

- ฟิล์มหนา จะต้องตรวจไม่น้อยกว่า 100 วงกล้อง ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า
- ฟิล์มบาง จะต้องตรวจไม่น้อยกว่า 500 วงกล้อง ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า

2.3.3 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Flow Cytometry¹⁶

- เก็บเลือด 120 mL ใน heparin 20 mL
- Fixation ใช้ 0.25% (v/v) glutaraldehyde 1 mL. ใน PBS ที่ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที สามารถเก็บได้นานหลายเดือน
- Permeabilization บั่นที่ 450g 5 นาที ตูด supernate ที่เติม 0.25% (v/v) triton X-100 ใน PBS 0.5 mL. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติมน้ำ PBS 1 mL. บั่นล้างอีกครั้ง
- Resuspend ใน PBS 5 mL. นับจำนวน RBC ด้วยเครื่อง automate blood cell analyzer คำนวณหาปริมาตรเพื่อให้ได้จำนวน 500,000 RBC เติมน้ำ MoAb-GPA-RPE 1 mL ทิ้งไว้ 30 นาที RT ในที่มืด
- Staining ย้อมสี 0.2 µg/mL AO หรือ 1 mg/mL PI หรือ 10 µg/mL TO
- ทิ้งไว้ในที่มืด RT, 30 นาที
- Enumeration ด้วยเครื่อง flow cytometer
- เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดได้แล้ว จึงทำการเตรียมชุดน้ำยาตรวจ M-cell Count Kit เปรียบเทียบ

วิธีที่หาได้กับวิธีการอื่นๆ

เปรียบเทียบ reproducibility โดยการทำ within-run coefficient of variation (OCV) และ between-run CV (RCV) อย่างละ 10 ค่า โดยวิธีการทั้งหมด เปรียบเทียบกันในตัวอย่างเลือด ทั้งหมด 42 ตัวอย่าง

3 ผลการทดลอง

3.1 ผลการทดลอง Retic-Count Kit

3.1.1 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจนับ reticulocytes ด้วยวิธี flow cytometry คือ fix ด้วย glutaraldehyde ความเข้มข้น 0.05% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที permeabilize ด้วย triton X-100 ความเข้มข้น 0.05% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที stain ด้วยสี AO ความเข้มข้น 0.02 µg/mL หรือสี TO ความเข้มข้น 1 µg/mL ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากพบว่า ให้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากวิธี dry method มากที่สุด และมี positive กับ negative population แยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน ที่สุด flow cytometric histograms ของ PBS control (รูปที่ 1) ของ สี AO (รูปที่ 2) และ สี TO (รูปที่ 3)

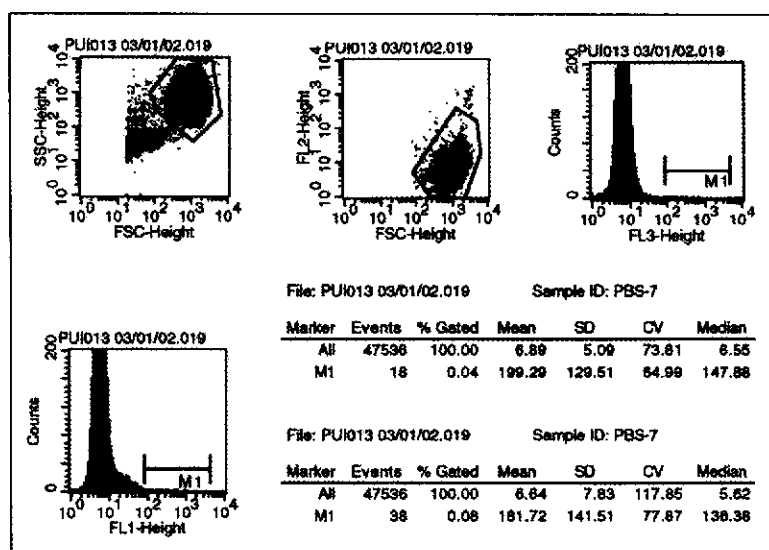
3.1.2 Percent OCV และ %RCV ของการตรวจนับ reticulocytes ด้วยวิธีต่างๆ (ตารางที่ 1)

3.1.3 ผลการตรวจนับ reticulocytes ของแต่ละวิธี (ตารางที่ 2)

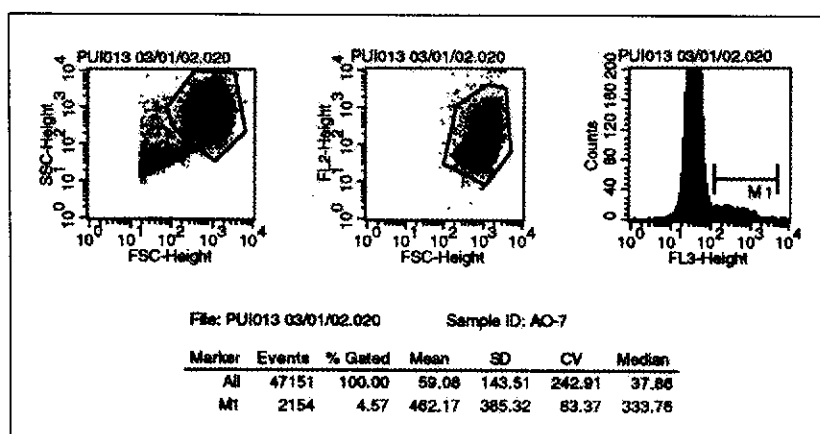
3.1.4 หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) และ p-value เทียบกับวิธี dry method (ตารางที่ 3)

ความเข้มข้น 0.02 mg/mL หรือสี TO ความเข้มข้น 1 mg/mL ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากพบว่า ให้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากวิธี dry method มากที่สุด และมี positive กับ negative population แยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนที่สุด flow cytometric histograms ของ PBS control ภาพที่ 1 ของ สี AO ภาพที่ 2 และ สี TO ภาพที่ 3

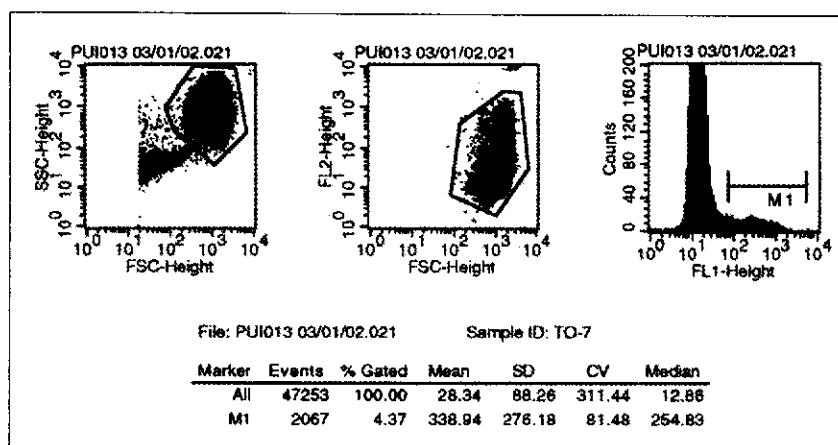
3.1.2 Percent OCV และ %RCV



รูปที่ 1 Flow Cytometric Histogram ของ PBS Control



รูปที่ 2 Flow Cytometric Histogram ของ Reticulocytes ที่ย้อมด้วยสี AO



รูปที่ 3 Flow Cytometric Histogram ของ Reticulocytes ที่ย้อมด้วยสี TO

ตารางที่ 1 ค่า % OCV และ RCV ของการตรวจนับ Reticulocytes ด้วยวิธีต่างๆ (10 replicates)

วิธีการ	%OCV	%RCV
Dry method	4.94	5.30
Wet method	4.94	5.25
Hemacytometer method	8.48	8.77
AO Chin-Yee method	5.17	8.23
TO Chin-Yee method	2.83	9.62
TO commercial kit method	2.30	4.63
AO modified method	1.80	2.28
TO modified method	1.47	2.05

ตารางที่ 2 ค่า Mean และ SD ของ %Reticulocytes จากวิธีต่างๆ (n=20)

วิธีการ	Mean	SD
Dry method	1.89	1.29
Wet method	1.94	1.30
Hemacytometer method	1.89	1.40
AO Chin-Yee method	1.88	1.27
TO Chin-Yee method	1.63	1.33
TO commercial kit method	1.89	1.34
AO modified method	1.84	1.36
TO modified method	1.85	1.37

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของวิธีต่างๆ เทียบกับวิธี Dry Method (n=20)

วิธีการ	ค่า r	ค่า p
Wet method	0.986	< 0.001
Hemacytometer method	0.980	< 0.001
AO Chin-Yee method	0.980	< 0.001
TO Chin-Yee method	0.926	< 0.001
TO commercial kit	0.975	< 0.001
AO modified method	0.974	< 0.001
TO modified method	0.970	< 0.001

3.2 ผลการทดลอง F-cell Count Kit

3.2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ นับ F-cells ด้วยวิธี flow cytometry คือ fix ด้วย glutaraldehyde ความเข้มข้น 0.05% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที permeabilize ด้วย triton X-100 ความเข้มข้น 0.1% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที stain ด้วย undiluted MoAb-HbF-FITC หรือ -RPE ปริมาตร 5 μ L ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากพบว่า ให้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้ จากวิธี acid elution test มากที่สุด และมี positive กับ negative population แยกออกจากกันได้ ชัดเจน

ที่สุด flow cytometric histograms ของ F-cells ที่ย้อมด้วย MoAb-HbF-FITC (รูปที่ 4) และ ที่ย้อมด้วย MoAb-HbF-RPE (รูปที่ 5)

3.2.2 Percent OCV และ %RCV ของการ นับ F-cells ด้วยวิธีต่างๆ (ตารางที่ 4)

3.2.3 ผลการตรวจนับ F-cells ด้วยวิธีต่างๆ (ตารางที่ 5)

3.2.4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) และ p value เทียบกับวิธี acid elution test (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 ค่า %OCV และ %RCV ของการตรวจนับ F-cells วิธีต่างๆ (10 replicates)

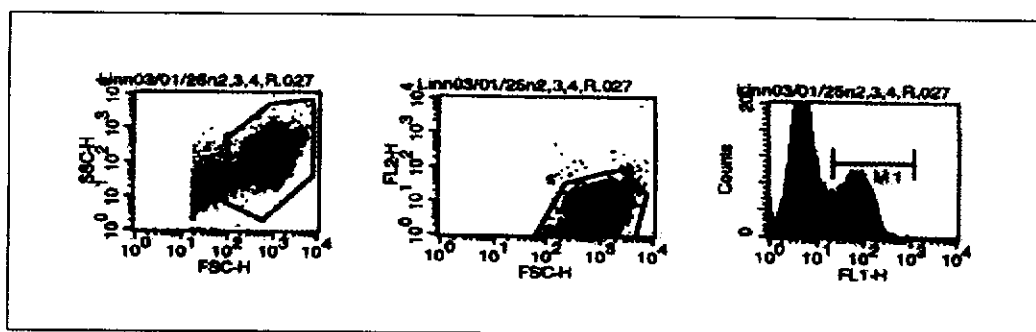
วิธีการ	%OCV	%RCV
Acid elution test	16.5	10.8
Alkaline denaturation	16.5	11.8
Flow cytometry : Chen method	6.4	6.3
BD Kit method FITC	2.5	5.1
Modified method FITC	1.6	7.4
Modified method RPE	5.4	9.3

ตารางที่ 5 ค่า Mean และ SD ของ %F-cells จากการตรวจนับวิธีต่างๆ (n=20)

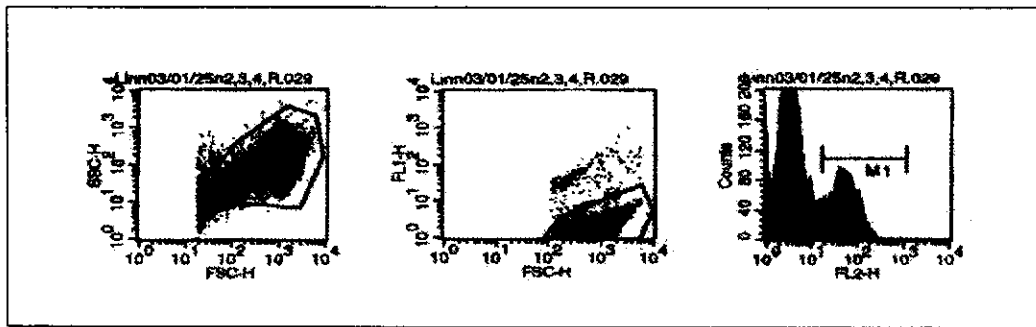
วิธีการ	Mean	SD
Acid elution test	28.3	38.1
<u>Alkaline denaturation test</u> (%HbF/F-cell)	20.2	17.8
<u>Flow cytometry</u> Chen method	31.5	35.9
BD Kit method FITC	30.3	37.0
Modified method FITC	31.3	35.4
Modified method RPE	31.4	35.7

ตารางที่ 6 ค่า Correlation coefficient (r) และค่า p-values เมื่อเปรียบเทียบกับ Acid Elution Test (n=20)

วิธีการ	r	p
<u>Flow cytometry :</u> Chen method	0.978	< 0.001
BD Kit method FITC	0.967	< 0.001
Modified method FITC	0.977	< 0.001
Modified method RPE	0.978	< 0.001



รูปที่ 4 Flow Cytometric Histogram ของ F-cells ที่ย้อมด้วย MoAb-HbF-FITC



รูปที่ 5 Flow Cytometric Histogram ของ F-cells ที่ย้อมด้วย MoAb-HbF-RPE

3.3 ผลการทดลอง M-cell Count Kit

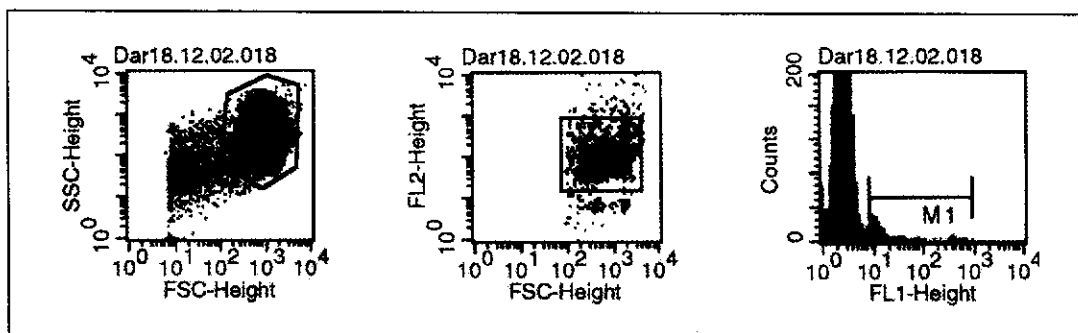
3.3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจนับ M-cells ด้วยวิธี flow cytometry คือ fix ด้วย glutaraldehyde ความเข้มข้น 0.25% ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที หรือ เก็บในตู้เย็นได้หลาย เดือน permeabilize ด้วย triton X-100 ความเข้มข้น 0.25% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที stain ด้วย undilute MoAb-GPA-RPE 1 mL ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด ตามด้วย 0.2 µg/mL AO หรือ 1 mg/mL PI หรือ 10 µg/mL TO ใน PBS ปริมาตร 500 mL ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด เนื่องจากพบว่า ให้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้

จากวิธี Giemsa stain บน thin blood films มากที่สุด และมี positive กับ negative population แยกออกจากกัน ได้อย่างชัดเจนที่สุด flow cytometric histograms ของ M-cells ที่ย้อมด้วย AO (รูปที่ 6) ที่ย้อมด้วย PI (รูปที่ 7) และ ที่ย้อมด้วย TO (รูปที่ 8)

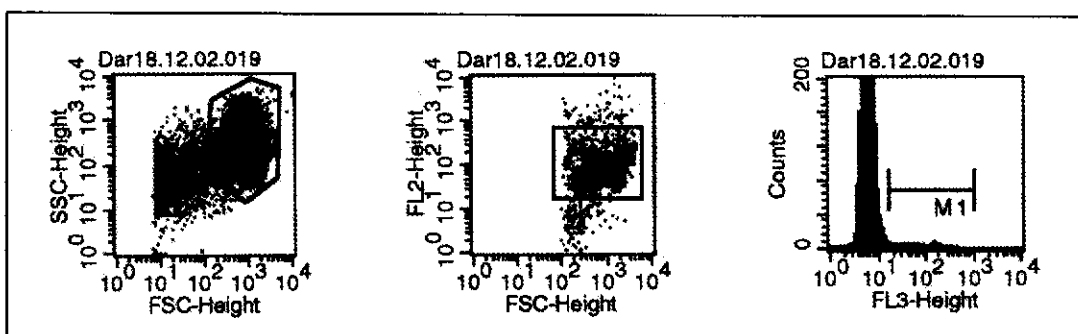
3.3.2 % OCV และ %RCV ของการนับ M-cells ด้วยวิธีต่างๆ (ตารางที่ 7)

3.3.3 ผลการตรวจนับ M-cells ด้วยวิธี ต่างๆ (ตารางที่ 8) เมื่อแยกกลุ่มตัวอย่าง (ตารางที่ 9)

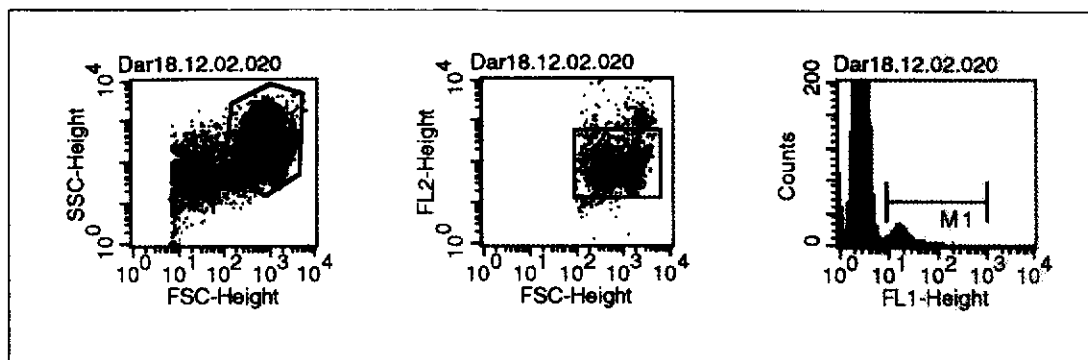
3.3.4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) และ p-value เทียบกับวิธี Giemsa stain (ตารางที่ 10)



รูปที่ 6 Flow Cytometric Histogram ของ M-cells ที่ย้อมสี Acridine Orange (A positive sample)



รูปที่ 7 Flow Cytometric Histogram ของ M-cells ที่ย้อมสี Propidium Iodide (A positive sample)



รูปที่ 8 Flow Cytometric Histogram ของ M-cells ที่ย้อมสี Thiazole Orange (A positive sample)

ตารางที่ 7 ค่า %OCV และ %RCV ของการตรวจนับ M-cells วิธีต่างๆ (10 replicates)

วิธีการ	%OCV	%RCV
Giemsa Stain (thin blood films)	8.1	9.3
Flow Cytometry (with AO stain)	6.5	6.1
Flow Cytometry (with PI stain)	5.6	24.0
Flow Cytometry (with TO stain)	10.0	23.1

ตารางที่ 8 ค่า Mean และ SD ของ %M-cells ที่ได้จากการตรวจนับวิธีต่างๆ (n=42)

วิธีการ	Mean	SD
Giemsa Stain (thin blood films)	0.20	0.68
Flow Cytometry (with AO stain)	0.62	0.70
Flow Cytometry (with PI stain)	0.31	0.21
Flow Cytometry (with TO stain)	0.55	0.56

ตารางที่ 9 ค่า Mean และ SD ของ %M-cells จากการตรวจนับวิธีต่างๆ แยกตามกลุ่มตัวอย่าง

วิธีการ	คนปกติ (n=11)	ผู้ป่วย Negative (n=20)	ผู้ป่วย Positive (n=11)
Giemsa Stain (thin blood films)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.75±1.21
Flow Cytometry (with AO stain)	0.24±0.12	0.66±0.76	0.91±0.80
Flow Cytometry (with PI stain)	0.15±0.06	0.30±0.18	0.48±0.23
Flow Cytometry (with TO stain)	0.19±0.10	0.50±0.41	1.00±0.78

ผู้ป่วย negative = ผู้ป่วยที่มีอาการแต่ตรวจ thick film ไม่พบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Giemsa stain

ผู้ป่วย positive = ผู้ป่วยที่มีอาการและตรวจ thick film พบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Giemsa stain

ตารางที่ 10 ค่า Correlation coefficient (r) และค่า P values เมื่อเทียบกับ Giemsa Stain (n = 42)

วิธีการ	r	p
Flow Cytometry (with AO stain)	0.558	<0.01
Flow Cytometry (with PI stain)	0.311	<0.05
Flow Cytometry (with TO stain)	0.803	<0.05

4. วิจัยและสรุปผลการทดลอง

4.1 วิจัยและสรุปผลการทดลอง Retic Count

สรุปผลการตรวจ 20 ตัวอย่าง จากทุกวิธี มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ คือ r เข้าใกล้ 1 และ $p < 0.001$ ค่าเฉลี่ยของแต่ละวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นวิธีย้อมสี TO ที่ได้ จากรายงานของ Chin-Yee¹¹ เพียงวิธีเดียวเท่านั้น ที่มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และชุดน้ำยาตรวจนับ reticulocytes ที่ได้พัฒนาขึ้นมาได้เตรียมได้ง่าย ค่าที่ตรวจได้มีความน่าเชื่อถือ มีความสัมพันธ์กันดีเมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้ในงานประจำวัน สามารถตรวจตัวอย่างเลือดได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น และมีคุณภาพทัดเทียมกับน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

4.2 วิจัยและสรุปผลการทดลอง F-cell Count

สรุปผลการตรวจ 20 ตัวอย่าง จากทุกวิธี มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ คือ r เข้าใกล้ 1 และ $p < 0.001$ ค่าเฉลี่ยของแต่ละวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัย

สำคัญ ($p > 0.05$) และน้ำยาที่พัฒนาขึ้นนี้ ให้ผลการตรวจใกล้เคียงกับวิธีที่ใช้ในงานประจำวัน มีคุณภาพทัดเทียมกับที่น้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ มีความน่าเชื่อถือสูง ใช้เวลาน้อย ประหยัด และ สะดวกในการตรวจนับครั้งละจำนวนมาก

4.3 วิจัยและสรุปผลทดลอง M-cell Count

การจะนำวิธี flow cytometry มาตรวจนับเม็ดเลือดแดงที่มี DNA ของเชื้อมาลาเรียหรือ M-cells ทดแทนการตรวจนับด้วยวิธี Giemsa stain ที่ใช้อยู่ในงานประจำวันในปัจจุบันจะต้องทำการศึกษาและพัฒนาคุณภาพต่อไป เช่น การใช้ RNase ในการย่อยสลาย RNA เพื่อลดสัญญาณรบกวนจาก reticulocytes แต่อย่างไรก็ตามวิธี flow cytometry มีความสะดวก เนื่องจากรายงานผลเป็นร้อยละของจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ มีความรวดเร็ว น่าเชื่อถือสูง และสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ในระดับต่ำๆ ดีกว่าวิธี Giemsa stain ที่ใช้ในปัจจุบัน

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการ
อุตสาหกรรมสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (IPUS)
ฝ่ายอุตสาหกรรม (ฝ่าย 5) สำนักงานกองทุนสนับสนุน
การวิจัย (สกว.) ประจำปี พ.ศ. 2545

เอกสารอ้างอิง

1. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์. โพลีไซโตเมทรี. กรุงเทพฯ : บริษัท วงตะวัน จำกัด, 2539: 137-224.
2. ยุทธนา หมั่นดี. Flow cytometry in hematology. เอกสารคำสอนกระบวนวิชา 501301. ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544.
3. วิษระ กลินฤกษ์. Flow cytometry. เอกสารคำสอนกระบวนวิชา 506302. ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544.
4. นวพรรณ จารุรักษ์. การตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocytes ด้วยเครื่องวิเคราะห์เลือดอัตโนมัติ Technicon H3. ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.
5. ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, ธวัช โตสิตารัตน์, ปฐมปฐมธนพงศ์, มงคล โชติยาภรณ์, สาคร พรประเสริฐ, ธัญรัตน์ จอมแก้ว, และคณะ. คู่มือปฏิบัติการโลหิตวิทยา. เชียงใหม่: หสน. ส.ทรัพย์การพิมพ์, 2543: 142-307.
6. สุนันท์ จำรูญ, นิพนธ์ กวีธาพล. คู่มือการตรวจชันสูตรทางโลหิตวิทยา. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์การศาสนา, 2529: 101-105.
7. อานนท์ บุญยะรัตเวช. เทคโนโลยีใหม่ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดแดง: โลหิตวิทยาเม็ดเลือดแดง. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี้พับบลิชชิง, 2535: 309-316.
8. Sanguansermsri T. Resistance of hemoglobin Bart's to acid elution. J Med Assoc Thailand 1978; 61: 62.
9. กลุ่มงานชันสูตร ศูนย์มาลาเรียที่ 2 จังหวัดเชียงใหม่ กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. ชันสูตรไข้มาลาเรีย โรคเท้าช้าง. ศูนย์มาลาเรียที่ 2 จังหวัดเชียงใหม่, 2539.
10. จันทรา เหล่าถาวร และ ศรัชัย หล่ออารีย์สุวรรณ. มาลาเรีย. คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540: 70-83.
11. Chin-Yee I, et al. Flow cytometric reticulocyte analysis using thiazole orange; clinical experience and technical limitations. Clin Lab Haematol 1991; 13: 177-188.
12. Wallach J. Reticulocyte count. In : Interpretation of Diagnostic Test. 7thed. New York : A Wolters Kluwer Company, 1998: 343-344.
13. Lesesve JF, Lacombe F, Marit G. High fluorescence reticulocytes are an indicator of bone marrow recovery after chemotherapy. Eur J Haematol 1995; 54: 61-63.
14. Chen JC, Bigelow N, Davis BH. Proposed flow cytometric reference method for the determination of erythroid F-cell counts. Cytometry 2000; 42: 239-246.
15. Munde Y, Bigelow NC, Davis BH, Porter JB. Simplified flow cytometric method for fetal hemoglobin containing red blood cells. Cytometry 2000; 42: 389-393.
16. Barkan D, Ginsburg H, Golenser J. Optimisation of flow cytometry measurement of parasitaemia in plasmodium infected mice. Int J Parasitol 2000; 30: 649-653.
17. Janse CJ, Van Vianen PH, Tanke HJ, et al. Plasmodium species: flow cytometry and microfluorometry assessments of DNA content and synthesis. Exp Parasitol 1987; 64: 88-94.
18. Van Vianen PH, Thaithong S, Reinders PP, et al. Automated flow cytometric analysis of drug susceptibility of malaria parasites. Am J Med Hyg 1990; 43: 602-607.
19. www.dpd.cdc.gov/.../MR/Malaria/body_Malaria_page1.htm
20. www.Google.com/Flowcytometerhttp:kumc.edu/.../medicine/pathology/ed/ch_4/c_4flow.gif
21. www.Google.com/Flowcytometerhttp:kumc.edu/.../medicine/pathology/ed/ch_4/c_4flow.gif