

A Study of Reference Interval for Platelet Aggregation Test Using Light Transmission Aggregometry in Thai Population

Pawadee Chinudomwong, Karan Paisooksantivatana and Narin Khongjaroensakun*

Hematology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Light transmission platelet aggregometry (LTA) is one of the most well-known techniques for platelet function testing. LTA reference value is affected by several variables, for instance, ethnicity and difference of protocol among laboratories. To date, no study has been carried out to determine the reference value of LTA in Thai population. This study then aimed to analyze the reference value of LTA prospectively performed at Haematology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University. Data were collected from January 2018 to December 2019. The results revealed that the percentages of maximum aggregation which is the principal interpretative parameter of various studied agonists were the followings: 64.79 to 103.30% for 5 µg/mL collagen; 53.76 to 104.56% and 59.94 to 100.70% for 5 and 10 µmol/L epinephrine, respectively; 57.68 to 97.06% and 62.79 to 100.51% for 5 and 10 µmol/L ADP, respectively; 62.63 to 93.99% for 1.2 mg/mL ristocetin, and 63.32 to 99.12% for 1.2 mmol/L arachidonic acid. These revealed the contrast of results according to a previous study due to ethnicity and experimental protocol differences. Therefore, it is highly recommended that each laboratory establishes its own LTA reference value.

Keywords: Reference value, Platelet aggregation test, Thai population, Normal range, Light transmission platelet aggregometry

*Corresponding author E-mail address: narin.kho@mahidol.edu

Received: 22 May 2020

Revised: 1 July 2020

Accepted: 23 November 2020

การหาค่าอ้างอิงของการทดสอบ platelet aggregation test ด้วยหลักการ light transmission aggregometry ในประชากรไทย

ภาวดี ชินอุดมวงษ์ การันต์ ไผ่สุสานติวัฒนา และ นรินทร์ คงเจริญสกุล*

ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวินิจฉัยการ ทำหน้าที่ผิดปกติของเกล็ดเลือด แต่กระนั้น ค่าอ้างอิงของการทดสอบได้รับผลกระทบจากตัวแปรหลาย ชนิด อาทิ เชื้อชาติ และความแตกต่างในขั้นตอนการวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ เนื่องจากยังไม่เคย มีการรายงานค่าอ้างอิงของการทดสอบดังกล่าวในประชากรไทยมาก่อน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ หาค่าอ้างอิงของการทดสอบซึ่งอาศัยหลักการ light transmission aggregometry ในการตรวจวิเคราะห์ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า โดยเก็บข้อมูลในห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2562 ผลการศึกษาพบว่า ค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลัก ที่ใช้ในการแปลผลการวิเคราะห์จำแนกตามชนิดและความเข้มข้นของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดเป็นดังนี้ คอลลาเจนที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ร้อยละ 64.79 ถึง 103.30 สำหรับ epinephrine ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 53.76 ถึง 104.56 และ 59.94 ถึง 100.70 ตามลำดับ ADP ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 57.68 ถึง 97.06 และ 62.79 ถึง 100.51 ตามลำดับ ristocetin ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ร้อยละ 62.63 ถึง 93.99 และ arachidonic acid ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 63.32 ถึง 99.12 ซึ่งแตกต่าง จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ เนื่องจากกลุ่มประชากรที่ศึกษาและขั้นตอนในการวิเคราะห์มีความ แตกต่างกัน ดังนั้น จึงแนะนำให้ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งหาค่าอ้างอิงของการทดสอบนี้ขึ้นเอง

คำสำคัญ: ค่าอ้างอิง การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ค่าปกติ ประชากรไทย การวัดการเกาะกลุ่มจากการส่งผ่าน ของแสง

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: narin.kho@mahidol.edu

รับบทความ: 22 พฤษภาคม 2563

แก้ไขบทความ: 1 กรกฎาคม 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 23 พฤศจิกายน 2563

บทนำ

การทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็นการทดสอบเพื่อประเมินความสามารถในการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือด (platelet function testing) สามารถทำการทดสอบได้หลายหลักการ เช่น impedance, single platelet counting และการตรวจการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากการส่งผ่านของแสง (light transmission aggregometry; LTA) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด⁽¹⁾

หลักการของ LTA คือ เมื่อเติมสารที่มีสมบัติเป็นตัวกระตุ้นเกล็ดเลือด (platelet agonist) เช่น คอลลาเจน epinephrine และ adenosine diphosphate (ADP) ลงไปในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก (platelet rich plasma; PRP) เกล็ดเลือดในพลาสมาจะถูกกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่ม ทำให้พลาสมาใสขึ้น เครื่องวิเคราะห์จะวัดการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ส่งผ่านจากหลอดทดลอง แล้วแปลงเป็นกราฟแสดงความสามารถในการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด พารามิเตอร์ที่ใช้ในการแปลผล ได้แก่ ค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุด (percentage of maximum aggregation) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลัก เวลาที่เกิดการเกาะกลุ่มสูงสุด (time to maximum aggregation; T_{max}) และความชันของกราฟ นอกจากนี้ ตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดบางชนิดยังมีพารามิเตอร์ที่สามารถใช้ประกอบการแปลผลเพิ่มเติม เช่น lag phase กรณีตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดชนิดคอลลาเจน ซึ่งเกิดจากระยะเวลาดังแต่เริ่มเติมตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดลงในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากจนกระทั่งเริ่มเกิดการเกาะกลุ่มหรือรูปร่างกราฟแสดงความสามารถในการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่แบ่งเป็นสองช่วง (biphasic aggregation) กรณีตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดชนิด epinephrine และ ADP เป็นต้น ซึ่งกราฟในช่วงแรกเกิดจาก

การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่เติมลงในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก จากนั้นเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะหลั่งตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่อยู่ภายในเกล็ดเลือดออกมาเพื่อกระตุ้นเกล็ดเลือดที่อยู่บริเวณใกล้เคียงให้เกิดการเกาะกลุ่มทำให้เกิดกราฟช่วงที่สอง^(2, 3) ดังตัวอย่างแสดงใน Fig. 1 หากพารามิเตอร์ใดมีค่าผิดปกติ จะถือว่าเกล็ดเลือดมีความผิดปกติของการทำงานผ่านกลไกที่กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดนั้นๆ ในการแปลผลการทดสอบ ต้องพิจารณาผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดหลายชนิดประกอบกัน เนื่องจากความผิดปกติของการทำงานของเกล็ดเลือดแต่ละโรคมีรูปแบบความผิดปกติของการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ต่างกันออกไป อาทิ ผู้ป่วยโรค Glanzmann thrombasthenia ซึ่งมีความผิดปกติของตัวรับสัญญาณไกลโคโปรตีนชนิด IIb/IIIa (glycoprotein IIb/IIIa receptor; GPIIb/IIIa) หรือผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของตัวรับสัญญาณดังกล่าว เช่น ยา abciximab, eptifibatide หรือ tirofiban จะมีค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดทุกชนิด ยกเว้น ristocetin ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าอ้างอิง เนื่องจาก ristocetin เป็นตัวกระตุ้นที่ไม่ได้ใช้ GPIIb/IIIa ในการกระตุ้นเกล็ดเลือด ในขณะที่ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือด แอสไพริน ควรจะมีค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดชนิดคอลลาเจน และ arachidonic acid ต่ำกว่าค่าอ้างอิง เนื่องจาก แอสไพริน มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase; COX) ทำให้เกล็ดเลือดไม่สามารถเปลี่ยน arachidonic acid เป็น Thromboxane A_2 ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด ดังนั้น แพทย์จึงใช้การทดสอบนี้ช่วยในการวินิจฉัยโรค

เลือดออกหยุดยากที่เกิดจากความผิดปกติของระบบการห้ามเลือดปฐมภูมิ (primary haemostasis) รวมถึงใช้ในการติดตามการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือดได้⁽⁴⁻⁶⁾

อย่างไรก็ตาม มีตัวแปรหลายชนิดที่สามารถส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ด้วยหลักการ LTA เช่น เชื้อชาติ การสูบบุหรี่ ยาที่รับประทาน การรับประทานยาที่มีไขมันสูงก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด ความเข้มข้นของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ใช้และวิธีการเตรียมพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก^(1, 2, 7-10) ดังนั้น ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจึงควรหาค่าอ้างอิงของการวิเคราะห์เอง^(4, 11, 12) ทั้งนี้ เนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานค่าอ้างอิงของการวิเคราะห์นี้ในประเทศไทยมาก่อน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่าอ้างอิงของการทดสอบนี้ที่ทำโดยหลักการ LTA ในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

ประชากรที่ศึกษา

งานวิจัยนี้มีลักษณะเป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า โดยเก็บข้อมูลจากอาสาสมัครอายุระหว่าง 18-50 ปีที่ผ่านเกณฑ์การคัดเข้าครบทุกข้อดังนี้ 1) ปฏิเสธประวัติโรคเลือดออกง่ายหยุดยากทั้งของตนเองและครอบครัว 2) ปฏิเสธประวัติการรับประทานยาใดๆ ในช่วง 14 วันก่อนเก็บตัวอย่างเลือด และ 3) ปฏิเสธประวัติสูบบุหรี่ อาสาสมัครที่มีคุณสมบัติตรงกับเกณฑ์คัดออกอย่างน้อย 1 ข้อ ได้แก่ 1) พบปัญหาจากการเก็บตัวอย่างเลือด เช่น มีก้อนเลือดในหลอดเลือด ปริมาตรเลือดไม่ได้สัดส่วนกับสารกันเลือดแข็งในหลอดเลือด 2) สีของพลาสมาผิดปกติ เช่น ขุ่นหรือมี hemolysis จนสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และ 3) ระดับเกล็ดเลือดในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากมีค่าน้อยกว่า 100,000/ μ L จะถูกคัดออกจากการวิจัยโดยพารามิเตอร์ที่ศึกษา ได้แก่ ค่าอัตราร้อยละของการ

เกาะกลุ่มสูงสุด เวลาที่เกิดการเกาะกลุ่มสูงสุด (time to maximum aggregation; T_{max}) lag phase และความชันของกราฟ ซึ่งมีนิยามดังแสดงใน Fig. 1 การเก็บข้อมูลดังกล่าวรวบรวมจากฐานข้อมูลที่บันทึกในเครื่องวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล (รหัสโครงการ MURA2020/299 Ref.106)

การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

อาสาสมัครแต่ละราย ได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดเลือดที่บรรจุโซเดียมซิเตรตเป็นสารกันเลือดแข็งโดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 3.2 ปริมาตร 5 มิลลิตร จำนวน 2 หลอด โดยขั้นตอนของการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดกระทำตามข้อกำหนดขององค์กร Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) รหัสเอกสาร H21-A5 และ H58-A เพื่อลดการกระตุ้นเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง (*in vitro* platelet activation)^(1, 13) จากนั้น หลอดเลือดทุกหลอดจะถูกนำไปปั่นที่ความเร็ว 180 g นาน 10 นาทีเพื่อให้ได้พลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก แบ่งพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากที่ได้ออกมาส่วนหนึ่งใส่หลอดพลาสติกเปล่าชนิดโพลีโพรพิลีน และนำเลือดส่วนที่เหลือไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 1,928 g นาน 10 นาทีเพื่อให้ได้พลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อย (platelet poor plasma; PPP) ตรวจระดับเกล็ดเลือดของพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman Coulter รุ่น DxH 800 ตัวอย่างที่มีระดับเกล็ดเลือดสูงกว่า 250,000/ μ L ต้องเจือจางด้วยพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อยของอาสาสมัครรายนั้น

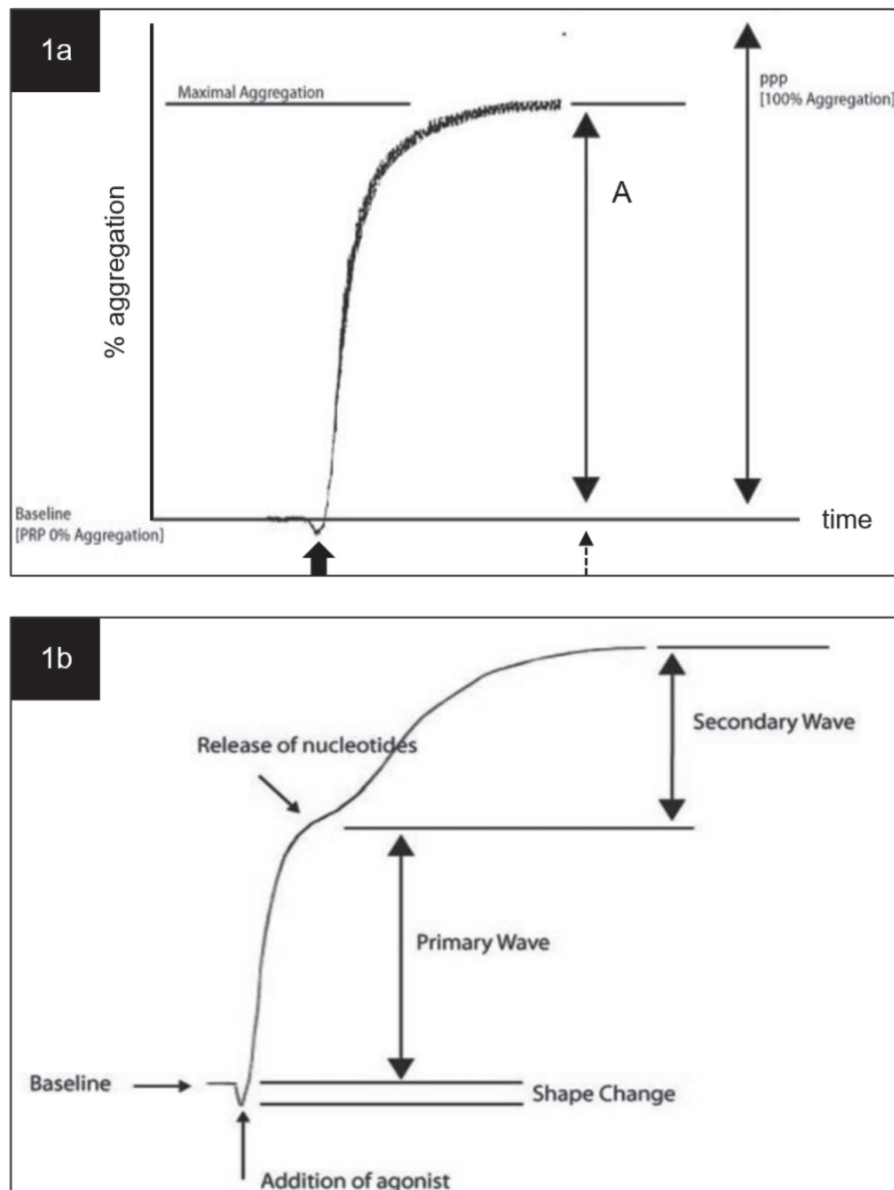


Fig. 1 An aggregation trace represents general (1a) and biphasic aggregation pattern (1b).

Baseline and 100% aggregation values were calculated from the O.D. of PRP and PPP, respectively. Percentage of maximum aggregation was calculated from the difference of O.D. between maximal aggregation point and baseline. In Fig. 1a, the thick and dash arrows demonstrate lag phase and T_{max} , respectively. Slope was calculated from the height of aggregation trace (double-headed arrow "A") divided by the reaction time. This figure was adapted from the original by Perry DJ.⁽¹⁹⁾

(autologous PPP) เพื่อปรับให้มีระดับเกล็ดเลือดเท่ากับ 250,000/ μ L ก่อน ตัวอย่างที่เตรียมไว้จะต้องนำไปตรวจวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมงนับตั้งแต่เวลาที่เจาะเก็บตัวอย่าง

เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้

งานวิจัยนี้ใช้เครื่องวิเคราะห์ Helena AggRAM (Helena Laboratories, Texas, USA) ก่อนการทดสอบทุกครั้งจะต้องปรับค่า optical density (O.D.) ของเครื่องให้เป็นศูนย์ (blank adjustment) โดยวัดค่า O.D. ของพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดน้อยของอาสาสมัครรายที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเริ่มทดสอบโดยการเติมตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมาก ปริมาตร 225 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด วิเคราะห์ภายใต้อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการคน (stir speed) 600 รอบต่อนาที และระยะเวลาสูงสุดในการทดสอบไม่เกิน 600 วินาที

ความเข้มข้นหลังเติมลงในพลาสมา (final concentration) ของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นไปตามคำแนะนำของ North American Specialized Coagulation Laboratory Association (NASCOLA)⁽⁴⁾ ได้แก่ คอลลาเจน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร epinephrine 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร ADP 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร ristocetin 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ arachidonic acid 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งทั้งหมดนี้เตรียมขึ้นจากน้ำยาสำเร็จรูป RevohemTM (HYPHEN BioMed, Neuville-sur-Oise, France) โดยเตรียมและเก็บรักษาน้ำยาตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (internal quality control; IQC) ของการทดสอบนี้จะกระทำทุกครั้งก่อนเริ่มทำการทดสอบในแต่ละวัน

ตามคำแนะนำของกลุ่มการใช้งานเครื่องวิเคราะห์ กล่าวคือ วัดค่า O.D. ของช่องวัดทุกช่องโดยใช้น้ำกลั่น กำหนดให้ค่า O.D. ของช่องวัดทุกช่องต้องอยู่ระหว่าง 0.145 ถึง 0.217 และความแตกต่างของค่า O.D. ในแต่ละช่องน้อยกว่าร้อยละ 10⁽¹⁴⁾

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทุกพารามิเตอร์ได้รับการวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูลด้วยการทดสอบทางสถิติ Shapiro-Wilk test การรายงานค่าอ้างอิงของพารามิเตอร์ที่มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นปกติ ทำในรูปของ mean $\pm$ 2SD ขณะที่ค่าอ้างอิงของพารามิเตอร์ที่มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นปกติ รายงานในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ โดยกำหนดค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของค่าอ้างอิงในแต่ละพารามิเตอร์ที่เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 2.5 และเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 97.5 ตามลำดับ การศึกษาเชิงสหสัมพันธ์ (correlation studies) ระหว่างพารามิเตอร์ด้านภูมิประชากรศาสตร์ (demographic data) กับพารามิเตอร์ที่ศึกษาได้รับการวิเคราะห์ด้วยการคำนวณสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ P -value น้อยกว่า 0.05 การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดทำโดยโปรแกรม MedCalc[®] Statistical Software รุ่น 19.2.1 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium)

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีอาสาสมัครเข้าร่วมรวมทั้งสิ้น 45 ราย เป็นเพศชาย 10 ราย (ร้อยละ 22.22 ของจำนวนอาสาสมัครทั้งหมด) ค่ามัธยฐานของอายุอาสาสมัครคือ 34 ปี (ค่าพิสัยควอไทล์ 27-41 ปี) ระดับเกล็ดเลือดในพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากได้รับการจำแนกตามชนิดและความเข้มข้นของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ใช้ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Demographic data in this study

Parameters	Results*
Male (%)	10/ 22 (45%)
Age (years)	34 (27-41)
Platelet count in PRP (μ L)	
- 5 μ g/mL collagen	285,000 (220,000-380,000)
- 5 μ mol/L epinephrine	290,000 (200,000-390,000)
- 10 μ mol/L epinephrine	314,000 (228,000-390,000)
- 5 μ mol/L ADP	292,500 (235,000-370,000)
- 10 μ mol/L ADP	296,500 (257,000-366,000)
- 1.2 mg/mL ristocetin	308,500 (262,000-385,000)
- 1.2 mmol/L arachidonic acid	314,000 (245,000-363,000)

*All results, except sex, were reported as median and interquartile range.

อนึ่ง จำนวนตัวอย่างที่ได้ทดสอบมากกว่าจำนวนอาสาสมัครในงานวิจัย เนื่องจากมีอาสาสมัครบางรายที่ได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดมากกว่าหนึ่งครั้ง นอกจากนี้ ตัวอย่างที่ได้รับการทดสอบด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดแต่ละชนิดมีจำนวนแตกต่างกัน เนื่องจากห้องปฏิบัติการจะทดสอบตัวอย่างจากอาสาสมัครด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดทุกชนิดและทุกความเข้มข้นเช่นเดียวกับที่ทดสอบกับผู้ป่วยด้วยเสมอ ตามข้อแนะนำของ Scientific and Standardization Committee (SSC/ISTH) และ NASCOLA^(4, 15) อีกทั้งห้องปฏิบัติการจำแนกการทดสอบนี้ออกเป็นหลายชุดตามวัตถุประสงค์ทางคลินิก การทดสอบแต่ละชุดจึงประกอบด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่มีชนิดและความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 2

ข้อมูลค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดเมื่อทดสอบด้วยตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดทุกชนิดและทุกความเข้มข้นยกเว้น ADP ที่ความเข้มข้น 5

ไมโครโมลต่อลิตร มีการกระจายตัวเป็นปกติ โดยผลของการศึกษาเป็นดังต่อไปนี้ ค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดของคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ร้อยละ 64.79 ถึง 103.30 สำหรับ epinephrine ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 53.76 ถึง 104.56 และ 59.94 ถึง 100.70 ตามลำดับ ADP ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 57.68 ถึง 97.06 และ 62.79 ถึง 100.51 ตามลำดับ ristocetin ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ร้อยละ 62.63 ถึง 93.99 และ arachidonic acid ที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร อยู่ที่ร้อยละ 63.32 ถึง 99.12

สำหรับข้อมูลของพารามิเตอร์อื่น ได้แก่ เวลาที่เกิดการเกาะกลุ่มสูงสุด lag phase และความชันของกราฟ ล้วนมีการกระจายตัวไม่เป็นแบบปกติ ผลการศึกษาดังแสดงใน Table 2 สำหรับการ

Table 2 The reference value of parameters in this study, categorized by type and concentration of platelet agonists

Platelet agonist & concentration	Number of tested samples	Parameters			
		MA (%)	Lag phase (secs)*	Slope*	Tmax (secs)*
5 µg/mL collagen	113	64.79 -103.30	0-20.31	107.32 - 233.56	138.65 - 384.5
5 µmol/L epinephrine	112	53.76 -104.56	n/a	19.22 - 122.86	155.60 - 548.70
10 µmol/L epinephrine	68	59.94 -100.70	n/a	30.24 - 113.26	152.20 - 424.80
5 µmol/L ADP	114	57.68 - 97.06*	n/a	51.35 - 174.20	100.90 - 425.60
10 µmol/L ADP	173	62.79 -100.51	n/a	86.75 - 180.38	110.25 - 329.45
1.2 mg/mL ristocetin	100	62.63 - 93.99	n/a	49.60 - 196.70	54.00 - 406.00
1.2 mmol/L arachidonic acid	109	63.32 - 99.12	n/a	82.69 - 251.38	93.00 - 277.38

Abbreviations: n/a, no data; MA, percentage of maximum aggregation; T_{max}, time to maximum aggregation; secs, seconds

*The results were reported as median and interquartile range.

ศึกษาเชิงสหสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ด้านภูมิประชากรศาสตร์กับพารามิเตอร์ที่ศึกษา ไม่พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างพารามิเตอร์ใด ๆ (ไม่แสดงข้อมูล)

วิจารณ์ผลการทดลอง

แม้การตรวจการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากการส่งผ่านของแสงจะเป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด แต่เนื่องจากตัวแปรหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งความแตกต่างในขั้นตอนการวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้การทดสอบนี้มีความแปรปรวนสูง ดังนั้น จึงมีการจัดทำแนวปฏิบัติสำหรับการทดสอบเพื่อให้ขั้นตอนการวิเคราะห์ในแต่ละห้องปฏิบัติการเป็นไปในแนวทางเดียวกัน ส่งผลให้ความแปรปรวนของการทดสอบลดลง^(1, 16) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุดซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลัก

ที่ใช้ในการแปลผลการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Hayward CPM และคณะ⁽¹⁷⁾ พบว่ามีความแตกต่างกันดังแสดงใน Table 3 เนื่องจากความแตกต่างของหลายปัจจัย อาทิ เครื่องวิเคราะห์ที่ใช้ ยี่ห้อ ความเข้มข้นของตัวกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ใช้ และขั้นตอนการเตรียมพลาสมาที่มีเกล็ดเลือดมากก่อนทำการทดสอบ ด้วยเหตุนี้ องค์การระดับนานาชาติ อาทิ SSC/ISTH และ NASCOLA จึงยังคงแนะนำให้ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งตรวจวิเคราะห์หาค่าอ้างอิงของการทดสอบนี้เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการของตนเอง^(2, 4)

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาในกลุ่มประชากรไทย ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน เชื่อว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เปิดให้บริการการทดสอบนี้ รวมถึงห้องปฏิบัติการที่วางแผนจะเปิดให้บริการการทดสอบนี้ต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ดี มีปัจจัยรบกวนหลายอย่างที่ยังไม่ได้รับการ

Table 3 Comparison of the percentage of maximum aggregation between this study and the study by Hayward CPM, *et al.**⁽¹⁷⁾

Platelet agonist	This study		Hayward CPM, <i>et al.</i>	
	Concentration	MA (%)	Concentration	MA (%)
collagen	5 µg/mL	64.79 - 103.30	5 µg/mL	85.00 - 104.00
epinephrine	5 µmol/L	53.76 - 104.56	6 µmol/L	9 - 100
epinephrine	10 µmol/L	59.94 - 100.70	10 µmol/L	n/a
ADP	5 µmol/L	57.68 - 97.06	5 µmol/L	43.00 - 97.00
ADP	10 µmol/L	62.79 - 100.51	10 µmol/L	n/a
ristocetin	1.2 mg/mL	62.63 - 93.99	1.25 mg/mL	75 - 100
arachidonic acid	1.2 mmol/L	63.32 - 99.12	1.6 mmol/L	77 - 99

Abbreviations: n/a, no data; MA, percentage of maximum aggregation

* Statistically significant difference cannot be analyzed due to the difference of data distribution.

ควบคุมที่ดีพอ เช่น การประเมินความผิดปกติของสีพลาสมาโดยการสังเกตด้วยตาเปล่า หรือการควบคุมการบริโภคอาหารบางชนิดที่มีผลต่อการทำงานของเกล็ดเลือด เช่น กาแฟ ก่อนเก็บตัวอย่างเลือด^(9, 18) ดังนั้น ในการให้บริการการทดสอบนี้ ควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อค่าอ้างอิงดังกล่าวข้างต้น

สรุป

ค่าอ้างอิงของการตรวจวิเคราะห์การทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ได้จากงานวิจัยนี้แตกต่างจากผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ เนื่องจากความแตกต่างของตัวแปรหลายชนิดที่สามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบ อาทิ เชื้อชาติ และความหลากหลายของขั้นตอนการวิเคราะห์ จึงแนะนำให้ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งทดสอบหาค่าอ้างอิงของการวิเคราะห์นี้ขึ้นเอง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณอนุชา สร้อยสำโรง คุณอัญชลี ฤกษ์นันท์ คุณสรณรงค์ พูลสวัสดิ์ คุณธรรดา แก้วใส คุณเกษมศรี เกื้อทาน คุณกังวาล คงบวรเกียรติ คุณศิริรัตน์ สदानสุข และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Clinical Laboratory Institute (CLSI) . H58-A: platelet function testing by aggregometry; approved guideline. First edit. Vol. 28. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Institute; 2008.

2. Cattaneo M, Hayward CPM, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 1029.
3. Lages B, Weiss HJ. Biphasic aggregation responses to ADP and epinephrine in some storage pool deficient platelets: relationship to the role of endogenous ADP in platelet aggregation and secretion. *Thromb Haemost* 1980; 43: 147-53.
4. Hayward CP, Moffat KA, Raby A, *et al*. Development of North American Consensus Guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2010 [cited 2018 Oct 2]; 134: 955-63. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCP9V3R-RVNZMKDS>
5. Bultas J. Antiplatelet therapy—A pharmacologist's perspective. *Cor Vasa* [Internet]. 2013; 55: e86-94. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010865013000325>
6. Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 314-22.
7. Born GVR. Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. *Nature* [Internet]. 1962; 194: 927-9. Available from: <https://doi.org/10.1038/194927b0>
8. O'Brien J. Platelet aggregation: Part II Some results from a new method of study. *J Clin Pathol* [Internet]. 1962; 15: 452-5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16810986>
9. Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 172-83.
10. Alessi M-C, Sié P, Payrastre B. Strengths and Weaknesses of Light Transmission Aggregometry in Diagnosing Hereditary Platelet Function Disorders. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Mar 12; 9: 763. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32178287>
11. Miller CH, Rice AS, Garrett K, Stein SF. Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects, contributing to a high rate of abnormal results. *Br J Haematol* [Internet]. 2014; 165: 842-53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24617520>

12. Moffat KA, Ledford-Kraemer MR, Nichols WL, Hayward CPM. Variability in clinical laboratory practice in testing for disorders of platelet function: results of two surveys of the North American Specialized Coagulation Laboratory Association. *Thromb Haemost* 2005; 93: 549-53.
13. Clinical & Laboratory Standards Institute. H21-A5: collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline. Fifth Edit. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Institute; 2008.
14. Helena Laboratories. AggRAM System: operator's manual. Texas: Helena Laboratories; p. 1-108.
15. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, *et al.* Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013, 11: 1183-9
16. Althaus K, Zieger B, Bakchoul T, Jurk K. Standardization of light transmission aggregometry for diagnosis of platelet disorders: an inter-laboratory external quality assessment. *Thromb Haemost* 2019; 119: 1154-61.
17. Hayward CPM, Moffat KA, Pai M, *et al.* An evaluation of methods for determining reference intervals for light transmission platelet aggregation tests on samples with normal or reduced platelet counts. *Thromb Haemost* 2008 Jul; 100: 134-45.
18. Natella F, Nardini M, Belelli F, *et al.* Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Br J Nutr* 2008 Dec; 100: 1276-82.
19. Perry DJ. Platelet function testing light transmission aggregometry [LTA] [Internet]. SANG Medicine. 2020 [cited 2020 Jul 4]. p. 7. Available from: https://practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_lta.html