

Comparison of Blood Smear Staining between Standard Conventional Method and Modified Rapid Staining

Tida Thoruksa* and Samang Muraka

Clinical Pathology and Technology Department, Queen Sirikit National Institute of Child Health, Bangkok, Thailand

Abstract

Clinical microscopy laboratories routinely use Wright-Giemsa stain to stain blood smear for complete blood count (CBC) analysis. Since Wright Giemsa stain preparation is time consumed with limited availability, commercial stain kits have been used with various staining procedures. It is a responsibility of the laboratories to choose qualified ready-made staining kits and make sure that they give a high staining quality. As various staining kits are provided with variety of staining procedures it is necessary to optimize the staining steps. The objective of the study was to evaluate blood smear staining quality scores between conventional and modified rapid staining methods. One hundred and thirty blood smear samples were stained by using conventional and modified rapid staining in duplication. All stained blood smears were evaluated under microscope and given the efficacy of staining scores in range of 1-5 points by two qualified medical technologists. Paired samples *t*-test was used to compare the efficacy of staining methods. The efficacy score comparison of the two blood smear staining methods was found to be significantly different ($p < 0.05$). The mean scores of conventional method and modified rapid method were 4.94 ± 0.23 points and 4.98 ± 0.13 points, respectively. Moreover, modified rapid staining only took 3 minutes 31 seconds to complete the staining steps as compared to 10 minutes 30 seconds for conventional method. In conclusion, the modified rapid staining method could be applied in routine CBC work due to the simplicity of the procedure, fastness, low cost and high quality.

Keywords: Blood smear staining, Complete blood count, Wright-Giemsa stain

*Corresponding author E-mail address: Airtho1@hotmail.com

Received: 25 August 2022

Revised: 19 October 2022

Accepted: 1 December 2022

เปรียบเทียบคุณภาพการติดสีของสเมียร์เลือดระหว่างการย้อมแบบดั้งเดิมกับแบบดัดแปลงรวดเร็ว

ธิดา ไทรักษา* และ สำอาง มุระคา

กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี

บทคัดย่อ

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิกใช้สีสำเร็จรูปย้อมสเมียร์เลือดในการตรวจวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC) เนื่องจากสารเคมีบางชนิดในการเตรียม Wright-Giemsa มีราคาสูงและหาซื้อได้ยาก จึงมีการเลือกใช้สีสำเร็จรูปที่หาได้ง่ายและราคาถูกมาใช้แทนการเตรียมสีเอง ขั้นตอนและเวลาในการย้อมสีมีความแตกต่างกัน ดังนั้น เพื่อให้เหมาะสมกับการปฏิบัติงาน จึงดัดแปลงขั้นตอนการย้อมสีให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบค่าคะแนนคุณภาพการติดสีของการย้อมสเมียร์เลือดระหว่างการย้อมสเมียร์เลือดแบบดั้งเดิมกับแบบดัดแปลงรวดเร็ว ใช้วิธีการศึกษาจากตัวอย่าง 130 ราย ทำโดยการย้อมสเมียร์เลือด 2 ชุดด้วย 2 วิธี ตรวจสเมียร์เลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยนักเทคนิคการแพทย์ 2 คน เพื่อให้คะแนนคุณภาพการติดสี 1-5 ตามลำดับ แล้วเปรียบเทียบผลรวมของค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพการติดสีทั้ง 2 วิธี วิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติ paired t-test ผลการศึกษา พบว่าการเปรียบเทียบค่าคะแนนเฉลี่ยของ 2 วิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพการย้อมสีแบบดั้งเดิม 4.94 ± 0.23 คะแนน ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพการย้อมสีแบบดัดแปลงรวดเร็ว 4.98 ± 0.13 คะแนน เวลาที่ใช้ในการย้อมแบบดั้งเดิม 10 นาที 30 วินาที แบบดัดแปลงรวดเร็ว 3 นาที 31 วินาที โดยสรุปวิธีการย้อมสีแบบดัดแปลงรวดเร็ว สามารถนำมาใช้ในการย้อมสเมียร์เลือดในงานประจำวันได้ ซึ่งช่วยลดเวลา ลดต้นทุน ไม่ยุ่งยาก และมีคุณภาพการติดสีดีกว่าแบบดั้งเดิม

คำสำคัญ: การย้อมสีสเมียร์เลือด การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด สีไรท์-จิมซ่า

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: Airtho1@hotmail.com

รับบทความ: 25 สิงหาคม 2565

แก้ไขบทความ: 19 ตุลาคม 2565

รับตีพิมพ์บทความ: 1 ธันวาคม 2565

บทนำ

การตรวจประจำวันทางโลหิตวิทยาด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติให้ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา ได้แก่ hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), red blood cell count, white blood cell count, platelet count, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) และ differential white blood cells อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ผลตรวจจากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติแสดงค่าผิดปกติหรือไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเป็นได้จากในส่วนของเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด การตรวจสเมียร์เลือดที่ผ่านการย้อมสีด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องจึงยังมีความจำเป็นในงานประจำวันทางโลหิตวิทยา⁽¹⁾

สีที่นิยมใช้ในการย้อมสเมียร์เลือด ได้แก่ สีย้อมในกลุ่ม Romanowsky stain ซึ่งคิดค้นขึ้นโดย Dmitri Leonidovich Romanowsky นักปริสตีวิทยาชาวรัสเซีย ในปี พ.ศ. 2434 โดยสี Romanowsky ประกอบด้วย methylene blue และ eosin Y โดย methylene blue เป็นสีในกลุ่ม basic dye และ eosin Y เป็นสีในกลุ่ม acid dye การทำปฏิกิริยาของสีเกิดขึ้นเมื่ออนุภาคของสีที่มีประจุบวกและลบรวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อน methylene blue eosinate ซึ่งมีสมบัติไม่ละลายน้ำ จึงต้องใช้ absolute methanol เป็นตัวทำละลาย สีย้อมที่ละลายในแอลกอฮอล์มีข้อจำกัด โดยพบว่าย้อมติดสเมียร์เลือดและไขกระดูกได้ไม่ค่อยดี จึงมีการประยุกต์และดัดแปลงวิธีการย้อมเพื่อให้การย้อมสเมียร์เลือดและไขกระดูกมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการหยดสีลงบนสไลด์ หรือจุ่มสไลด์ลงในสีก่อน แล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์หรือจุ่มสไลด์ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งหากทำเช่นนี้จะทำให้สีแตกตัวเป็นอนุภาคของสีที่อยู่ในภาวะที่ไม่สมดุลชั่วขณะ ส่งผลให้เซลล์และองค์ประกอบ

ภายในเซลล์มีโอกาสที่จะติดสีดีขึ้น ในช่วงที่เกิดการแตกตัวของสีได้อนุภาคของสีนั้นจะสังเกตเห็นรอยฝ้าเป็นมันวาวเรียกว่า metallic sheen ลอยอยู่ที่ผิวหน้าของสารละลายบัฟเฟอร์การที่จะย้อมสีได้ดีหรือไม่ดีขึ้นอยู่กับ การดัดแปลงส่วนประกอบของสีให้เหมาะสม จึงมีการคิดค้นและดัดแปลงส่วนประกอบของสี Romanowsky หลายสูตรด้วยกัน เช่น Wright's stain, Wright-Giemsa stain, Leishman stain, May Grunwald-Giemsa stain และ Jenner's stain ซึ่งมีส่วนประกอบของสีและวิธีเตรียมที่แตกต่างกัน สีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ สี Wright-Giemsa⁽²⁾

สีสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายโดยทั่วไปช่วยลดความยุ่งยากในการเตรียมสี ใช้เวลาในการย้อมประมาณ 5-10 นาที⁽³⁾ สี Wright-Giemsa ที่เตรียมเองโดยห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยมีการทดลองดัดแปลงสูตรการเตรียมสีและวิธีการย้อมสีให้ใช้เวลาย้อมเพียง 1 นาที มีส่วนผสมดังนี้ absolute methanol 2.5 ลิตร, wright's stain 7.5 กรัม, Giemsa powder 2.5 กรัม, azure B 2.5 กรัม, eosin Y 2.5 กรัม และ methylene blue 1.5 กรัม แต่ azure B มีราคาสูงมากและมีผู้นำเข้าจากต่างประเทศน้อยหาซื้อยาก จึงเปลี่ยนมาใช้สีสำเร็จรูปที่หาซื้อได้ง่ายและมีราคาถูก แต่ขั้นตอนและเวลาของสีสำเร็จรูปใช้เวลานานไม่เหมาะสมกับงานที่ต้องตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทุกราย เป็นงานเร่งด่วนที่ต้องการความรวดเร็วแม่นยำ จึงได้ดัดแปลงขั้นตอนการย้อมให้ใช้เวลาลดลงและคุณภาพการติดสีอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบค่าคะแนนคุณภาพการติดสีของสเมียร์เลือดระหว่างการย้อมแบบดั้งเดิมกับแบบดัดแปลงรวดเร็วที่ได้พัฒนาขึ้น

วัสดุและวิธีการ

การวิจัยนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี

เลขที่: REC. 104/2564 (Exemption) รหัสโครงการ: Document No. 64-042 เลขที่เอกสารรับรอง: REC. 104/2564 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คำนวณจากโปรแกรม n4Studies: for testing two independent means โดยใช้ค่า mean และ SD จากการศึกษาสำรอง ขนาดตัวอย่างทดสอบทั้ง 2 วิธี ได้จำนวน 33 ราย^(4, 5) เพื่อความแม่นยำจึงเลือกใช้ตัวอย่างทดสอบ 130 ราย ในการย้อมสเมียร์เลือดทั้งสองวิธี

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างสเมียร์เลือด

เลือกตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจ CBC ในงานประจำวัน จำนวน 130 ราย นำมาเตรียมสเมียร์เลือด 2 แผ่น ต่อเลือด 1 ราย นำสเมียร์เลือดมาแบ่งออกเป็น 2 ชุด (A และ B) โดยชุด A ย้อมแบบดั้งเดิมด้วยเครื่องอัตโนมัติ และชุด B ย้อมแบบดัดแปลงรวดเร็วที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น กำหนดหมายเลข A1-A130 และ B1- B130 โดยผู้ร่วมวิจัยเป็นผู้ย้อมทั้งสองวิธี หลังจากนั้นนำสเมียร์เลือดทั้งหมดที่ย้อมแล้วมาปิดบังหมายเลข ให้นักเทคนิคการแพทย์ 2 คนประเมินคะแนนคุณภาพการติดสีของสเมียร์เลือด 260 แผ่น โดยแต่ละคนทำการประเมินสเมียร์เลือดทั้งหมดที่ย้อมด้วย 2 วิธีดังกล่าว

เกณฑ์การประเมินคะแนนคุณภาพการติดสี

การติดสีของสเมียร์เลือดพิจารณาจากการติดสีของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด การติดสีของนิวเคลียส ไซโทพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือด รวมทั้งพื้นสีของสเมียร์ และ inclusion ที่อาจพบได้โดยให้คะแนน 1-5 ดังนี้⁽⁶⁾

คะแนน 1 คือ ไม่ติดสีทั้ง polymorphonuclear cells, mononuclear cells, red blood cells และ platelets

คะแนน 2 คือ ไม่สามารถแยกชนิดเม็ดเลือดได้บางชนิด และการติดสีเข้มหรือจางเกินไป พื้นที่ระหว่างเม็ดเลือดมีสีติด

คะแนน 3 คือ สามารถแยกชนิดของเม็ดเลือดได้ทั้ง polymorphonuclear cells, mononuclear cells, red blood cells และ platelets แต่การติดสีเข้มหรือจางเกินไป

คะแนน 4 คือ สามารถแยกชนิดของเม็ดเลือดได้ทั้ง polymorphonuclear cells, mononuclear cells, red blood cells และ platelets แต่การติดสีไม่ครบถ้วนตามมาตรฐานที่กำหนด

คะแนน 5 คือ ติดสีครบถ้วนตามมาตรฐานที่กำหนดทั้ง polymorphonuclear cells, mononuclear cells, red blood cells และ platelets

นำคะแนนคุณภาพการติดสีของสเมียร์เลือดที่อ่านโดยนักเทคนิคการแพทย์ทั้ง 2 คน ในแต่ละแบบของการย้อมสี มาหาค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบประสิทธิภาพการติดสี โดยใช้สถิติ paired samples t-test ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีการย้อมสเมียร์เลือดแบบดั้งเดิมโดยเครื่องอัตโนมัติ ADI STAIN WG-901⁽⁷⁾

1. เตรียมสเมียร์เลือดที่แห้งแล้วนำไปตรึงใน absolute methanol โดยการจุ่มผ่านหนึ่งครั้ง (ใช้เวลาประมาณ 1 วินาที)

2. นำสเมียร์เลือดที่ตรึงแล้ววางใน rack slide (วางได้สูงสุด 5 แผ่น) กดปุ่ม start เครื่องจะย้อมสเมียร์เลือดตามโหมดการทำงานที่ตั้งค่าไว้ โดยจุ่มในสารละลายสีเป็นเวลา 3 นาที แล้วเลื่อนไปจุ่มในสารละลายบัพเฟอร์ 5 นาที ต่อจากนั้นล้างสเมียร์เลือดและเป่าลมให้แห้งนาน 2 นาที แต่สเมียร์เลือดยังไม่แห้งสนิท ต้องเป่าด้วยเครื่องเป่าลมอีก 30 วินาที รวมใช้เวลาทั้งหมด 10 นาที 30 วินาที

3. นำสเมียร์เลือดที่ย้อมเสร็จแล้วไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีการย้อมสเมียร์เลือดแบบดัดแปลงรวดเร็ว

1. นำสี Wright-Giemsa A เทใส่ coplin jar ปิดฝาเพื่อป้องกันการระเหยของสี ส่วน Wright-Giemsa B solution ไม่ได้ใช้งาน

2. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ โดยการเติมสี Wright-Giemsa A ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใน coplin jar เติมน้ำประปา 60 มิลลิลิตร (1:3) ผสมให้เข้ากัน จะเห็นรอยฟ้าเป็นมันวาว (metallic sheen) บนผิวหน้าของสารละลายบัฟเฟอร์ ปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0

3. นำสเมียร์เลือดที่แห้งแล้ว จุ่มลงใน Wright-Giemsa A (ไม่ต้องตริงใน absolute methanol) แล้วยกขึ้นทันที (ใช้เวลาประมาณ 1 วินาที) แชลงในสารละลายบัฟเฟอร์ ในข้อ 2 เป็นเวลานาน 3 นาที

4. เมื่อครบเวลา นำสเมียร์เลือดออกจากสารละลายบัฟเฟอร์ ล้างด้วยน้ำประปา เป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลมเย็นประมาณ 30 วินาที เช็ดด้านหลังสเมียร์เลือดให้สะอาด นำสเมียร์เลือดไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ รวมใช้เวลาย้อม 3 นาที 31 วินาที

ผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้เปรียบเทียบการย้อมสีสเมียร์เลือดโดยใช้วิธีดัดแปลงรวดเร็วที่พัฒนาขึ้นในหน่วยงาน กับวิธีดั้งเดิม จากการทดสอบเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการย้อม พบว่าวิธีย้อมสเมียร์เลือดแบบดั้งเดิมใช้เวลา 10 นาที 30 วินาที ส่วนแบบดัดแปลงรวดเร็วใช้เวลา 3 นาที 31 วินาที ซึ่งต่างกัน 6 นาที 59 วินาที

การติดสีของเซลล์เม็ดเลือดในการย้อมสเมียร์เลือดแบบดั้งเดิม แสดงใน Fig. 2 ส่วนการ

ติดสีของเซลล์เม็ดเลือดในการย้อมสเมียร์เลือดแบบดัดแปลงรวดเร็ว เป็นไปตามมาตรฐาน เห็นลักษณะนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชัดเจน มีเพียงบางแผ่นเท่านั้นที่อาจพบการติดสีของเม็ดเลือดแดงจางลง แต่ยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังแสดงใน Fig. 3

การประเมินระดับคะแนนของการย้อมสีสเมียร์เลือดแบบดั้งเดิม พบว่าได้ 4 คะแนน 15 ครั้ง และได้ 5 คะแนน 245 ครั้ง ส่วนการประเมินระดับคะแนนของการย้อมแบบดัดแปลงรวดเร็ว พบว่าได้ 4 คะแนน 3 ครั้ง และได้ 5 คะแนน 257 ครั้ง ดังแสดงใน Table 1

การประเมินคะแนนค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการย้อมสีโดยนักเทคนิคการแพทย์ที่มีประสบการณ์ 2 คน พบว่าการย้อมสีสเมียร์เลือดแบบดั้งเดิม มีค่าเฉลี่ย 4.94 ± 0.23 ส่วนการย้อมแบบดัดแปลงรวดเร็ว มีค่าเฉลี่ย 4.98 ± 0.13 โดยประสิทธิภาพการย้อมสีทั้งสองวิธีนี้ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบการให้คะแนนของนักเทคนิคการแพทย์ที่มีประสบการณ์ทั้งสองคนที่ประเมินการย้อมสีทั้งสองแบบ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

วิจารณ์

การย้อมสีแบบดัดแปลงรวดเร็วที่พัฒนาขึ้นเองเพื่อใช้ในการย้อมสีสเมียร์เลือด พบว่าคุณภาพการติดสีดีกว่าการย้อมแบบดั้งเดิม เห็นได้จากค่าคะแนนคุณภาพการติดสีที่ย้อมแบบดั้งเดิม มีความถี่ของการได้คะแนนระดับ 4 มากกว่าการย้อมแบบดัดแปลงรวดเร็ว และมีความถี่ของการได้คะแนนระดับ 5 น้อยกว่าการย้อมแบบดัดแปลงรวดเร็ว เมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ในการย้อมแบบดัดแปลงรวดเร็ว พบว่าใช้เวลาน้อยกว่าการย้อมแบบดั้งเดิมมาก (น้อยกว่า 6 นาที 59 วินาที) วิธีการย้อมสีแบบดัดแปลงรวดเร็วทำได้

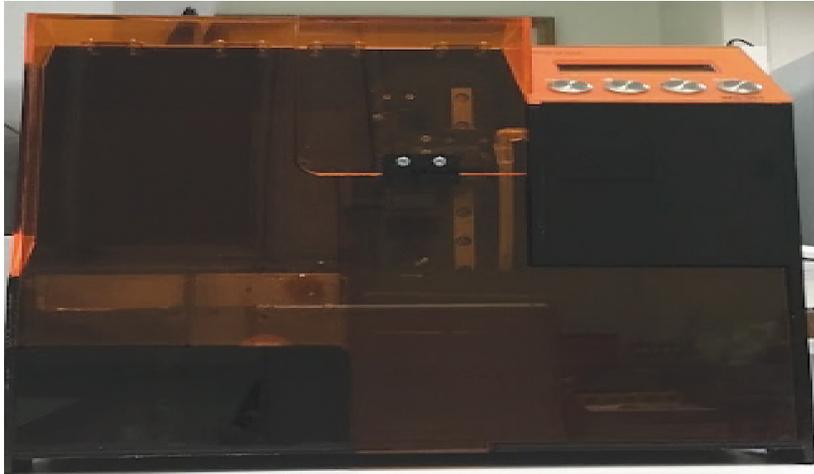
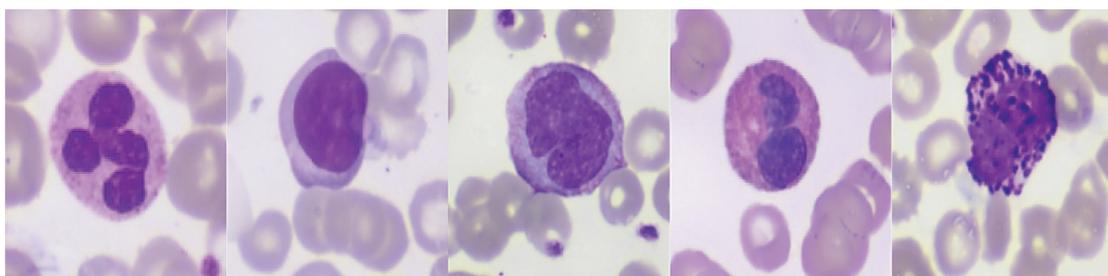


Fig. 1 A: Automate Slide Stainer ADI STAIN WG-901.⁽⁷⁾



B: Modified rapid blood smear stain.



neutrophil

lymphocyte

monocyte

eosinophil

basophil

Fig. 2 Photomicrograph of blood cells by using conventional blood smear stain.

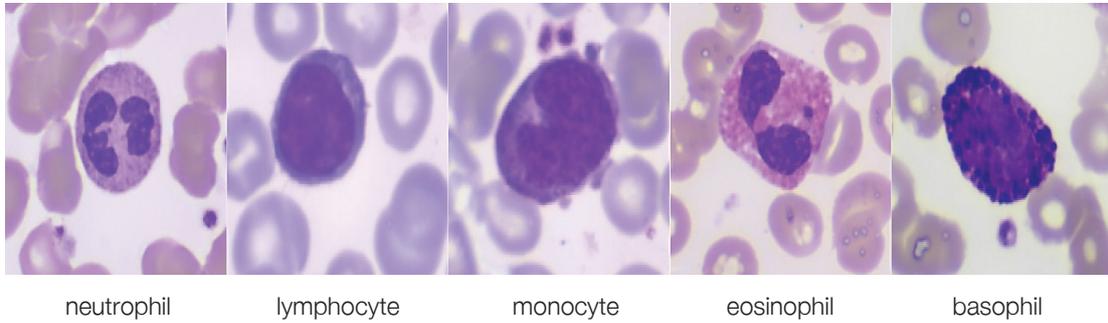


Fig. 3 Photomicrograph of blood cells by using modified rapid blood smear stain.

Table 1 Rating score for conventional and modified rapid blood smear stain methods.

Method	Number of blood smears	Number of blood smears in each scoring scale				
		1	2	3	4	5
MT1A	130	-	-	-	8	122
MT2A	130	-	-	-	7	123
MT1B	130	-	-	-	1	129
MT2B	130	-	-	-	2	128
MTA1+MTA2	260	-	-	-	15	245
MTB1+MTB2	260	-	-	-	3	257

MT1A = 1st Evaluator, Conventional method

MT2A = 2nd Evaluator, Conventional method

MT1B = 1st Evaluator, Modified rapid method

MT2B = 2nd Evaluator, Modified rapid method

ง่าย ไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องมีการบำรุงรักษาเครื่องย้อมสี และมีความสะดวกรวดเร็ว

การพบ pseudo hypochromia ใน Fig. 3 เป็นปัญหาหนึ่งที่น่าจะเกิดขึ้นได้จากการตรึงสเมียร์เลือดในสารละลายสี Wright-Giemsa ที่มีการพร่องของ absolute methanol จากการระเหยออกจากภาชนะบรรจุ หรืออาจเกิดจากสเมียร์เลือดยังไม่แห้งดีพอก่อนขั้นตอนการตรึง ปัญหานี้สามารถป้องกันได้โดยการย้อมสเมียร์เลือดทันทีหลังจากสเมียร์เลือดแห้ง

สนิท รวมถึงการปิดฝาภาชนะบรรจุสีย้อมให้สนิทอยู่เสมอ ตรวจสอบปริมาตรสีย้อมในภาชนะบรรจุเป็นประจำ และเติมสีย้อมเมื่อปริมาตรสีย้อมในภาชนะบรรจุลดลง

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Phudphad C. และคณะ⁽⁶⁾ ที่ศึกษาการย้อมสีสเมียร์เลือดโดยการตรึงสเมียร์เลือดด้วย absolute methanol ตามด้วยการย้อมในสีที่มีส่วนผสมของสี Wright-Giemsa กับสารละลายบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:2 และใช้เวลา

Table 2 Comparison of scoring evaluated by 2 evaluators.

Method Evaluators	N	Mean \pm SD (minimum, maximum)	95% CI		p-value
			Lower	Upper	
MT1A	130	4.94 \pm 0.24 (4, 5)	-	-	-
MT2A	130	4.95 \pm 0.23 (4, 5)	-	-	-
MT1B	130	4.97 \pm 0.15 (4, 5)	-	-	-
MT2B	130	4.98 \pm 0.12 (4, 5)	-	-	-
MT1A+MT2A	130	4.94 \pm 0.23 (4, 5)	-0.023	0.007	0.319
MT1B+MT2B	130	4.98 \pm 0.13 (4, 5)	-0.023	0.007	0.319
Different of 2 methods	130	4.94 \pm 0.23 4.98 \pm 0.13	-0.070	-0.007	0.018

*Statistically significant at 0.05 levels using paired samples t-test.

MT1A = 1st Evaluator, Conventional method

MT2A = 2nd Evaluator, Conventional method

MT1B = 1st Evaluator, Modified rapid method

MT2B = 2nd Evaluator, Modified rapid method

ในการย้อมสีนาน 6 นาที พบการติดสีได้มาตรฐานและสีที่ผสมคงประสิทธิภาพได้นาน 36 นาที ในการศึกษานี้ผู้วิจัยไม่ได้ตรึงสเมียร์เลือดใน absolute methanol โดยตรง แต่จุ่มสเมียร์เลือดลงไปในสี Wright-Giemsa ซึ่งมี absolute methanol เป็นตัวทำลายสีอยู่แล้ว หลังจากนั้นจึงย้อมด้วยสีที่เตรียมโดยการผสมสี Wright-Giemsa กับน้ำประปา ในอัตราส่วน 1:3 เป็นเวลานาน 3 นาที แล้วล้างสเมียร์เลือดด้วยน้ำประปา สีที่เตรียมนี้มีความคงตัวอยู่ได้นานกว่า 36 นาที โดยการสังเกตสีจางมองไม่เห็นรอยฝ้าที่เป็นมันวาว เหตุผลที่มีความคงตัวของสีนานกว่า อาจเป็นเพราะการตรึงสเมียร์เลือดใน Wright-Giemsa แล้วจุ่มลงในสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้มีสีไปเพิ่มในภาชนะบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์มากขึ้นเป็นลำดับ ทำให้สีที่เพิ่มลงไปใหม่มีการแตกตัวเพิ่มเติม สีจึงคงตัวอยู่ได้นานกว่าจากการสังเกตพบว่าการติดสีเริ่มจางลงหลังจากย้อมสเมียร์เลือดได้ 150 แผ่น จึงควรเปลี่ยนสารละลาย

บัฟเฟอร์ เพื่อให้คงคุณภาพการติดสีที่ดี

จากการศึกษาของ Wae-arsae W. และคณะ⁽⁸⁾ ที่เปลี่ยนวิธีการย้อมแบบดั้งเดิมจากแนวนอนเป็นการจุ่ม โดยตัดแปลงเป็นเครื่องย้อมอัตโนมัติ ปรับวิธีการย้อมโดยใช้เวลาประมาณ 6 นาที สเมียร์เลือดที่ย้อมด้วยวิธีดังกล่าวมีการติดสีดีกว่าการย้อมแบบดั้งเดิม พบว่ามีความแตกต่างจากการศึกษา โดยที่ Wae-arsae W. และคณะ ได้ตรึงสเมียร์เลือดด้วย absolute methanol และย้อมด้วยสี Wright stain ที่มีความเข้มข้นเท่าเดิม ส่วนสารละลาย eosin และ methylene blue นั้นเจือจางน้ำเปล่าในอัตราส่วน 3:1 และวิธีการย้อมสีทำโดยการจุ่มสเมียร์เลือดในสี Wright ตามด้วยการจุ่มในน้ำเปล่า จุ่มในสารละลาย eosin จุ่มในน้ำเปล่า จุ่มในสารละลาย methylene blue และจุ่มในน้ำเปล่าเป็นขั้นตอนท้ายสุด จะเห็นว่าการย้อมสีที่ปรับวิธีดังกล่าวมีความซับซ้อน ต่างจากการศึกษาครั้งนี้ ที่พบว่าการย้อมแบบดัดแปลงรวดเร็ว

ที่ได้พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพการคิดสีดีกว่าการย้อมแบบดั้งเดิมอย่างชัดเจน และใช้เวลาในการย้อมสีน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม การย้อมสีสเมียร์เลือดอาจมีการปรับเปลี่ยนไปตามความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการ โดยยึดหลักความมีประสิทธิภาพตามมาตรฐานเป็นสิ่งสำคัญ

สรุป

การย้อมสเมียร์เลือดแบบดัดแปลงรวดเร็วเปรียบเทียบกับแบบดั้งเดิม พบว่าแบบดัดแปลงรวดเร็วให้คุณภาพการคิดสีดีกว่าแบบดั้งเดิม ใช้เวลาในการย้อมสีน้อยกว่า ขั้นตอนการย้อมง่าย สะดวก รวดเร็ว ลดต้นทุน ไม่ต้องใช้ absolute methanol และ Wright-Giemsa B solution (buffer) ให้การคิดสีสม่ำเสมอ มีตะกอนน้อย ไม่จำเป็นต้องกรองสีก่อนใช้งาน และสามารถเติมสี Wright-Giemsa A solution เพิ่มได้เมื่อปริมาตรสีลดลง และควรเปลี่ยนภาชนะบรรจุสีใหม่ทุก 2 สัปดาห์ หรือเมื่อย้อมได้ประมาณ 1,200 แผ่น เพื่อป้องกันการตกตะกอนของสี การเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์หลังจากย้อมสเมียร์เลือดได้ 150 แผ่น จะช่วยให้ได้คุณภาพการคิดสีที่ดีต่อเนื่อง วิธีการย้อมสีแบบดัดแปลงรวดเร็วนี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานประจำวัน แต่มีข้อควรระวังคือการป้องกันไม่ให้มีน้ำปนเปื้อนเข้าไปในสี เนื่องจากสเมียร์เลือดไม่ได้ตรึงด้วย absolute methanol ก่อนย้อม หากมีน้ำปนเปื้อนเข้าไปในสีอาจทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานจุลทรรศนศาสตร์คลินิกทุกท่าน และ ผศ.ดร.พรรณนภา เกาทอง หมอวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความช่วยเหลือ

เอกสารอ้างอิง

1. Gulati G, Song J, Florea A D, Gong J. Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review. *Ann Lab Med* 2013 Jan; 33: 1-7
2. Dunning K, Safo A O. The ultimate Wright - Giemsa stain: 60 years in the making. *Biotec Histochem* 2011 Apr: 86: 69-75
3. Baso Biotech Co., Ltd. Documentation for use of reagents. Wright - Giemsa stain. New Taipei City 23666, Taiwan.
4. Bernard, R. (2000). *Fundamentals of biostatistics* (5thed.). Duxbery: Thomson learning, 308.
5. Ngamjarus C, Chongsuvivatwong V. (2014). n4Studies: Sample size and power calculations for android. The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program - The Thailand Research Fund & Prince of Songkla University.
6. Phudphad C, Jirattikul S, Hoanon O, *et al.*, Wright - Giemsa blood smear staining by mix dip method. *NU Science Journal* 2009; 6: 66-73. (in Thai)
7. Well Gate A.D.TECH CO., LTD. Documentation for use of ADI STAINWG -901. Automatic Slide Stainer Stain.
8. Wae-arsae W, Jitpranee S, Arwaekaji F. Applied Combine Wright and Dip Quick Staining Machine. *Journal of Health Science* 2015; 24: 153-60. (in Thai)