

Efficiency of Rapid Brilliant Cresyl Blue Staining for Detecting Hemoglobin H Inclusion Bodies in Red Blood Cells

Ekkapong Boriboonwong^{1*} and Plubplueng Sansai²

¹*Division of Clinical Hematology and Microscopy, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province, Thailand*

²*Division of Clinical Chemistry and Toxicology, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province, Thailand*

Abstract

Hemoglobin H disease can be diagnosed by the identification of hemoglobin (Hb) H inclusion in red blood cells; however, a long incubation period of the blood-dye mixture is required for the testing procedure. The objective of this study was to investigate the impact of shortening the Brilliant cresyl blue staining duration on the ability to identify HbH inclusion bodies in red blood cells. Blood samples were collected from 28 HbH disease patients and 30 healthy individuals. Hemoglobin typing was conducted by using HPLC. Incubation of the blood with Brilliant cresyl blue at 37°C for 30 and 120 minutes were set up for the detection of HbH inclusion bodies. Paired student's *t*-test were utilized to assess the reliability of the test results and the variances in the number of HbH inclusion bodies. There were no HbH inclusion bodies found in the healthy control bloods. Conversely, the HbH inclusion bodies were detected in all HbH disease samples at the incubation times of 30 and 120 minutes. The quantities of HbH inclusion bodies at 30- and 120-minute incubation times were 43.7 ± 23.6 and 39.9 ± 22.1 , respectively. There was no statistical significance in both incubation times ($p < 0.05$). These reveal significant amounts of HbH inclusion bodies detected following 30 minutes staining. Therefore, the identification of HbH inclusion elements using this 30 minutes staining method could facilitate a better turnaround time.

Keywords: Hemoglobin H inclusion, Red blood cell, HbH disease, Alpha globin gene

*Corresponding author E-mail address: ekaphong.bo@up.ac.th

ประสิทธิภาพของการย้อม Brilliant Cresyl Blue อย่างรวดเร็ว เพื่อตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

เอกพงศ์ บริบุญวงศ์^{1*} และ พลัปปึง แสนใส²

¹แขนงวิชาโลหิตวิทยาและจุลทรรศณศาสตร์คลินิก สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

²แขนงวิชาเคมีคลินิกและพิษวิทยา สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

บทคัดย่อ

การตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถช่วยวินิจฉัยโรคฮีโมโกลบินเอชได้ อย่างไรก็ตามขั้นตอนการตรวจจำเป็นต้องอุ่นเลือดกับสีย้อมไว้เป็นเวลานาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการปรับลดระยะเวลาการย้อมด้วย Brilliant cresyl blue ในการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันในเซลล์เม็ดเลือดแดง ตัวอย่างเลือดคนปกติ จำนวน 30 ราย และผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช จำนวน 28 ราย ถูกนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีด้วยการอุ่นส่วนผสมเลือดกับสี Brilliant cresyl blue ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และ 120 นาที วิเคราะห์ความถูกต้องของผลการตรวจโดยใช้ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเป็นมาตรฐาน วิเคราะห์ความสอดคล้องของผลการตรวจ และเปรียบเทียบจำนวนฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีด้วยสถิติ paired student's *t*-test จากการศึกษา ผู้วิจัยตรวจไม่พบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในกลุ่มตัวอย่างคนปกติ ขณะที่ตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในกลุ่มผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชทุกราย และให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 100 ทั้งการย้อมด้วยเวลา 30 และ 120 นาที จำนวนฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีที่ย้อมด้วยเวลา 30 และ 120 นาที เท่ากับ 43.7 ± 23.6 และ 39.9 ± 22.1 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การย้อมเป็นเวลา 30 นาทีมีแนวโน้มที่ตรวจพบจำนวนฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีได้มากกว่า ดังนั้นการย้อม Brilliant cresyl blue เป็นเวลา 30 นาที สามารถตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเม็ดเลือดแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาการตรวจและการรอคอยผลได้

คำสำคัญ: ฮีโมโกลบินเอชอินคลูชัน เซลล์เม็ดเลือดแดง โรคฮีโมโกลบินเอช ยีนแอลฟาโกลบิน

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: ekaphong.bo@up.ac.th

รับบทความ: 20 มีนาคม 2567

แก้ไขบทความ: 20 มิถุนายน 2567

รับตีพิมพ์บทความ: 27 กรกฎาคม 2567

บทนำ

โรคฮีโมโกลบินเอชเป็นโรคในกลุ่มแอลฟาธาลัสซีเมีย (α -thalassemia) ที่มีสาเหตุจากการขาดหายไปหรือมีความบกพร่องของยีนที่สร้างสาย α -globin มากถึง 3 ยีนจากทั้งหมด 4 ยีน ($--/\alpha$ หรือ $--/\alpha\alpha^T$ หรือ $--/\alpha^T\alpha$) ทำให้สายโปรตีน α -globin ถูกสร้างลดลงอย่างมากและเป็นผลให้สายโปรตีน β -globin อิสระคงเหลืออยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก จนเกิดการเข้าคู่กันเอง 4 สาย (β_4) เรียกฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดนี้ว่า “ฮีโมโกลบินเอช (HbH)” ซึ่งไม่เสถียร สามารถตกตะกอนภายในเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกทำลายของเซลล์ได้ ผู้ที่เป็นโรคนี้จึงมักจะมีภาวะโลหิตจาง⁽¹⁾ โรค HbH มีรายงานพบร้อยละ 0.1-0.5 ในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทะเลเมดิเตอร์เรเนียน⁽²⁾

ด้วยโครงสร้างระดับโมเลกุลของ HbH ไม่เสถียร HbH จึงถูกออกซิไดซ์ได้ด้วยสี Brilliant cresyl blue หรือ methylene blue (redox dye) ได้⁽³⁾ ซึ่งเมื่อย้อมเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยสีดังกล่าวและอุ่นไว้ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง HbH จะถูกออกซิไดซ์และตกตะกอนเป็นเม็ดกลมสีน้ำตาลคล้ายลูกกอล์ฟอยู่ภายในเซลล์ (golf-ball like inclusion) เรียกว่าฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี ซึ่งมองเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดาที่กำลังขยาย 400-1,000 เท่า⁽³⁻⁶⁾ ผลการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยโรค HbH จะตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีได้ร้อยละ 100 โดยพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอินคลูชันดังกล่าวร้อยละ 33-95 ของเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด⁽⁴⁾ หลายการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าของการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในผู้เป็น α -thalassemia ที่มี

genotype ต่าง ๆ ได้แก่ $-\alpha/\alpha$, $-\alpha/-\alpha$, $--/\alpha\alpha$, $--/-\alpha$ พบว่าการทดสอบอินคลูชันบอดีให้ผลบวก (ตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีอยู่ภายในเซลล์) ได้ในทุก genotype ในผู้ที่มี genotype ชนิด $-\alpha/\alpha$ ให้ผลบวกต่อการตรวจฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีเพียงร้อยละ 59 เช่นเดียวกับผู้ที่มี genotype $-\alpha/-\alpha$ โดยพบมีอัตราส่วนของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1:1,000-1:10,000 ส่วนในผู้เป็นพาหะ α -thalassemia 1 ($--/\alpha\alpha$) พบมีอัตราการให้ผลบวกสูงถึงร้อยละ 87 (7 รายใน 8 ราย)⁽⁵⁾ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอัตราการตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีจะเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนยีน α -globin ที่ผิดปกติไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Adirojnanon P และคณะ⁽⁴⁾ ที่ทำการศึกษายปริมาณ HbH และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีของผู้ป่วยโรค HbH ชนิด deletion ($--/-\alpha$) และ non-deletion ($--/\alpha^T\alpha$) ซึ่งพบว่าตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยทุกราย (ร้อยละ 100) โดยพบมีปริมาณมากถึงร้อยละ 67 ± 21 ในผู้ป่วยกลุ่ม deletion และร้อยละ 79 ± 18 ในผู้ป่วยกลุ่ม non-deletion

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจคัดกรองความผิดปกติของยีน α -globin ด้วยการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี โดยการย้อมด้วยสี Brilliant cresyl blue⁽⁶⁾ โดยศึกษาในตัวอย่าง 509 ราย จากผู้ที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงตัวเล็กและมีจำนวนมากกว่าค่าปกติ ผลการศึกษาพบว่าผู้เป็นพาหะ α -thalassemia 1 จำนวน 180 ราย ตรวจพบอินคลูชันบอดีทุกราย (ร้อยละ 100) โดยอัตราการพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี

0.1-30 ต่อ 1,000 เซลล์เม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นการตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในสภาวะอื่นที่ไม่มีความผิดปกติของยีน α -globin ได้ด้วย (false positive) ซึ่งพบได้สูงถึงร้อยละ 8.2 เช่น พาะ β -thalassemia ภาวะซีดจากการขาดธาตุเหล็ก อย่างไรก็ตาม ผลการตรวจไม่พบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในคนปกติ ดังนั้นการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือที่สามารถช่วยในการคัดกรองพาะ α -thalassemia ได้ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีความชุกของ α -thalassemia สูง⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Chan AY และคณะ⁽⁸⁾ พบว่าการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีมีความไวต่อการคัดกรองผู้เป็นโรค HbH และพาะ α -thalassemia 1 ร้อยละ 100 และ 95 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบผลบวกปลอมได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะขาดธาตุเหล็ก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pan LL และคณะ⁽⁶⁾ การตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดงจึงเป็นการทดสอบที่มีความไวต่อการวินิจฉัยโรค HbH ซึ่งสามารถทำได้ง่ายไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ปัจจุบันจึงมีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในโรงพยาบาลทั่วประเทศ

แม้ว่าการย้อมฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถช่วยวินิจฉัยโรค HbH ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งชนิดที่เป็น deletional HbH (HbH) และ non-deletional HbH (HbH-CS) และโดยเฉพาะในรายที่มีผลการตรวจ Hb typing ไม่พบการปรากฏของ HbH บน electrophoregram หรือ chromatogram⁽⁹⁾ แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัดคือใช้เวลาในการตรวจนาน เนื่องจากต้องอุ่นส่วนผสมเลือดกับสี Brilliant cresyl blue ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน อีกทั้งต้องใช้เวลาในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นเวลานาน รวมทั้งจำเป็นต้องใช้

ผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจด้วย จึงทำให้มีระยะเวลารอคอยผลที่นานในโรงพยาบาลบางแห่งกำหนดการรอคอยผลนานถึง 24-48 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยล่าช้าได้ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจโดยการปรับลดระยะเวลาการอุ่นส่วนผสมเลือดกับสี Brilliant cresyl blue โดยยังให้ผลการตรวจที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการย้อมตามวิธีมาตรฐาน⁽¹⁰⁾ ก็จะช่วยทำให้สามารถตรวจและรายงานผลได้เร็วขึ้น ลดระยะเวลาการรอคอยผล แพทย์สามารถให้การวินิจฉัยและวางแผนการรักษาผู้ป่วยได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการหน่วยจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่ HREC-UP-HSST 1.2/012/67

ตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยา

งานวิจัยนี้ทำการศึกษากับตัวอย่างเลือดที่มี ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็งที่เหลือจากการตรวจในงานประจำวันจากผู้เข้ารับบริการในโรงพยาบาลพะเยา จำนวน 58 ราย จำแนกเป็นคนปกติ (ไม่มีภาวะซีดและค่าพารามิเตอร์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่พบมีค่าต่ำหรือสูงกว่าปกติในทุกพารามิเตอร์ และมีผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินเป็น A_2A และมีปริมาณ HbA_2 อยู่ในช่วงปกติ (ร้อยละ 2.0-3.5)) จำนวน 30 ราย คัดเลือกจากกลุ่มผู้มารับบริการตรวจสุขภาพประจำปี และผู้ป่วยโรค HbH จำนวน 28 ราย (วินิจฉัยจากการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน โดยมีการปรากฏของ HbH บน chromatogram)

การตรวจวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง 8 ค่าประกอบด้วย red blood cell (RBC) count, hemoglobin concentration (Hb),

hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) และ red cell distribution width (RDW) ด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติยี่ห้อ Sysmex รุ่น XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) ตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Premier-Resolution high pressure liquid chromatography (Trinity Biotech, Bray, County Wicklow, Ireland) การตรวจพารามิเตอร์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง และ Hb typing ดำเนินการภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างเลือด

การตรวจหา HbH inclusion bodies

ตัวอย่างเลือดทั้ง 58 ราย ถูกนำมาตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของฮีโมโกลบินและเซลล์เม็ดเลือดแดง ตัวอย่างเลือดทุกรายถูกเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการทดสอบ ตัวอย่างเลือดทั้งหมดถูกแบ่งเลือดออกเป็น 2 ชุด (A และ B) ขั้นตอนการตรวจจะทำการผสมตัวอย่างเลือด 1 ส่วนกับ 1% Brilliant cresyl blue 1 ส่วน ในหลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิเมตร ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส โดยชุด A จะใช้เวลาการอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที⁽¹⁰⁾ และชุด B จะใช้เวลาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำส่วนผสมจำนวน 20 ไมโครลิตร มาหยดลงบนสไลด์แก้วแล้วไลสเมียร์บางจำนวน 3 แผ่น ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 นาที แล้ว

ทำการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้จะพบตะกอนฮีโมโกลบินติดสีน้ำเงิน มีลักษณะกลมคล้ายลูกกอล์ฟ (golf-ball like inclusion) การตรวจและนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ทำโดยนักเทคนิคการแพทย์ที่มีความชำนาญ จำนวน 3 คน โดยแต่ละคนทำการตรวจสเมียร์ทั้งหมดที่ย้อมด้วย 2 สภาวะดังกล่าว เพื่อความเที่ยงตรงของการตรวจ ผู้วิจัยได้ทำการกำหนดเป็นรหัสบนสไลด์ โดยนักเทคนิคการแพทย์จะไม่ทราบกลุ่มตัวอย่างและสภาวะการย้อม นักเทคนิคการแพทย์ทำการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 1,000-1,500 เซลล์ และคำนวณปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้เป็นร้อยละของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตรวจทั้งหมด

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ที่ตรวจโดยนักเทคนิคการแพทย์ทั้ง 3 คน ในทั้ง 2 สภาวะมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบจำนวนฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ระหว่าง 2 สภาวะด้วยสถิติ paired student's *t*-test และระหว่างชนิดของโรค HbH ด้วย สถิติ independent student's *t*-test วิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (IBM SPSS Inc, USA. Ver. 22) ค่า *p* value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและดัชนีเม็ดเลือดแดง ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินของตัวอย่างกลุ่มคนปกติทั้ง 30 ราย แสดงใน Table 1 โดยผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินพบเป็นชนิด A_2A ทั้งหมด มีลักษณะโครมาโตแกรมดังแสดงใน Fig. 1A มีปริมาณ HbA_2 เท่ากับร้อยละ 2.9 ± 0.27 (ร้อยละ 2.3-3.3) และ HbF เท่ากับ ร้อยละ 0.25 ± 0.42 (ร้อยละ 0.0-1.3) ผลตรวจวิเคราะห์พารามิเตอร์เซลล์เม็ดเลือดแดงพบว่าตัวอย่างทุกรายไม่มีภาวะโลหิตจาง และไม่พบว่ามีเม็ดเลือดแดงชนิด microcyte และ hypochromia มีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ RBC count, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW เท่ากับ $4.43 \pm 0.35 \times 10^6/\text{ไมโครลิตร}$, 13.52 ± 0.97 กรัม/เดซิลิตร, ร้อยละ 39.56 ± 2.45 , 89.52 ± 3.84 เฟมโตลิตร, 30.59 ± 1.60 พิโกกรัม, 34.18 ± 1.06 กรัม/เดซิลิตร, ร้อยละ 13.23 ± 0.99 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยโรค HbH มีค่าเท่ากับ 4.49 ± 0.87 ($\times 10^6/\text{ไมโครลิตร}$), 8.25 ± 1.17 กรัม/เดซิลิตร, ร้อยละ 27.60 ± 3.62 , 62.48 ± 6.13 เฟมโตลิตร, 18.63 ± 1.63 พิโกกรัม, 29.87 ± 1.42 กรัม/เดซิลิตร, ร้อยละ 24.76 ± 1.99 ตามลำดับ ตัวอย่างทั้งหมดแสดงภาวะโลหิตจางที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงแบบ microcytic hypochromic anemia (Table 2) ผลการตรวจ Hb typing พบเป็นชนิด A_2AH จำนวน 19 ราย มีลักษณะโครมาโตแกรมดังแสดงใน Fig. 1B และ CSA_2AH จำนวน 9 ราย (Fig. 1C) ปริมาณ HbA_2 และ HbH สรุปไว้ใน Table 2

ผลตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีโดยนักเทคนิคการแพทย์ทั้ง 3 คน พบว่าในกลุ่ม

ตัวอย่างคนปกติทั้ง 30 ราย ตรวจไม่พบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี ทั้งที่อุ้มนาน 30 นาที และ 120 นาที ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ย้อมได้แสดงดัง Fig. 2 ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค HbH ทั้ง 28 ราย ตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีทั้ง 2 ระยะเวลาการย้อม ลักษณะของฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีที่พบในเซลล์เม็ดเลือดแดงแสดงไว้ใน Fig. 3 และ 4 โดยให้ผลการตรวจพบฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีสอดคล้องกันจากนักเทคนิคการแพทย์ทั้ง 3 คน ดังแสดงใน Table 3

ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในผู้ป่วยโรค HbH แต่ละราย ทั้งการย้อมที่ใช้เวลา 30 และ 120 นาที สรุปไว้ใน Table 4 การย้อมที่ใช้เวลา 30 นาที ตรวจพบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 43.70 ± 23.55 (5.30-80.16) และ 39.90 ± 22.06 (4.95-75.82) เมื่อใช้เวลาย้อม 120 นาที (Table 5) ซึ่งค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ดังกล่าวทั้ง 2 ระยะเวลาการย้อมนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยดังกล่าวระหว่างการย้อมที่ใช้เวลา 30 และ 120 นาที จำแนกตามชนิดของโรค HbH พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p = 0.002$ ในโรค HbH และ $p = 0.012$ ในโรค HbH-CS การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีระหว่างผู้ป่วยโรค HbH และ HbH-CS พบว่า ผู้ป่วยโรค HbH มีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ดังกล่าวต่ำกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรค HbH-CS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ ของทั้ง 2 ระยะเวลาการย้อม ดังแสดงใน Table 5

Table 1 Hematological parameters, red blood cell indices, Hb typing, and relative amounts of each Hb fraction from 30 healthy individuals.

No.	Hematological parameters							Hb typing			
	RBC (x10 ⁶ /uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Hb type	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
1	4.99	14.40	42.10	84.40	28.90	34.20	13.70	A ₂ A	90.40	3.20	0.00
2	4.61	13.30	39.90	86.60	28.90	33.30	13.00	A ₂ A	89.80	2.30	0.00
3	4.27	12.60	38.00	89.00	29.50	33.20	14.20	A ₂ A	88.00	2.50	0.40
4	4.28	13.90	42.00	98.10	32.50	33.10	12.40	A ₂ A	88.20	3.20	0.00
5	4.05	12.60	36.50	90.10	31.10	34.50	13.40	A ₂ A	90.30	3.20	0.00
6	4.71	13.40	40.40	85.80	28.50	33.20	14.00	A ₂ A	89.30	3.20	0.00
7	4.79	15.20	42.50	88.70	31.70	35.80	11.30	A ₂ A	90.10	3.00	0.00
8	5.15	15.10	44.10	85.60	29.30	34.20	12.00	A ₂ A	88.70	2.70	0.00
9	4.82	13.80	42.10	87.30	28.60	32.80	12.80	A ₂ A	89.00	2.70	0.80
10	4.04	12.90	37.20	92.10	31.90	34.70	12.50	A ₂ A	87.90	3.10	0.80
11	4.58	13.60	39.10	85.40	29.70	34.80	13.80	A ₂ A	88.90	2.60	0.00
12	4.33	13.50	39.30	90.80	31.20	34.40	12.40	A ₂ A	89.70	2.90	0.00
13	4.82	15.50	45.20	93.80	32.20	34.30	12.90	A ₂ A	86.30	2.60	0.00
14	4.72	14.10	40.10	85.00	29.90	35.20	13.70	A ₂ A	88.30	3.10	0.00
15	4.36	13.40	39.50	90.60	30.70	33.90	13.20	A ₂ A	87.50	3.20	0.00
16	4.25	14.50	39.20	92.20	34.10	37.00	13.40	A ₂ A	86.80	3.20	0.00
17	4.56	14.30	41.50	91.00	31.40	34.50	14.90	A ₂ A	82.90	2.40	0.90
18	4.17	12.60	38.10	91.40	30.20	33.10	13.40	A ₂ A	87.80	2.80	0.60

Table 1 Hematological parameters, red blood cell indices, Hb typing, and relative amounts of each Hb fraction from 30 healthy individuals. (Cont.)

No.	Hematological parameters							Hb typing			
	RBC (x10 ⁶ /uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Hb type	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
19	4.44	13.30	38.60	86.90	30.00	34.50	12.70	A ₂ A	88.80	2.90	0.00
20	4.34	12.60	36.70	84.60	29.00	34.30	13.60	A ₂ A	87.70	3.00	0.70
21	3.87	12.50	36.70	94.80	32.30	34.10	13.50	A ₂ A	87.80	3.00	0.00
22	3.70	12.10	35.70	96.50	32.70	33.90	12.60	A ₂ A	88.50	3.10	0.00
23	4.45	12.10	38.00	85.40	27.20	31.80	13.10	A ₂ A	86.20	2.70	1.10
24	4.35	14.50	40.30	92.60	33.30	36.00	13.20	A ₂ A	87.10	3.00	1.00
25	3.96	12.20	37.30	94.20	30.80	32.70	14.00	A ₂ A	88.90	2.80	0.00
26	4.25	13.70	40.10	94.40	32.20	34.20	11.70	A ₂ A	89.80	2.60	0.00
27	4.87	14.60	42.10	86.40	30.00	34.70	13.40	A ₂ A	89.40	3.30	0.00
28	4.02	12.10	34.90	86.80	30.10	34.70	15.30	A ₂ A	87.30	2.70	1.30
29	4.58	13.50	40.40	88.20	29.50	33.40	15.30	A ₂ A	88.80	3.20	0.00
30	4.50	13.70	39.10	86.90	30.40	35.00	11.40	A ₂ A	89.70	2.80	0.00

RBC: red blood cell; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width

Table 2 Hematological parameters, red blood cell indices, Hb typing and relative amounts of each Hb fraction from 28 HbH disease patients.

No.	Hematological parameters							Hb typing			
	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Hb type	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbH (%)
1	5.17	9.40	30.50	59.00	18.20	30.80	25.30	A ₂ AH	89.30	1.60	2.50
2	3.41	6.90	22.10	64.80	20.20	31.20	24.80	A ₂ AH	88.10	1.40	4.20
3	5.11	8.70	29.90	58.50	17.00	29.10	25.90	A ₂ AH	91.10	1.40	4.70
4	3.93	6.90	22.50	57.30	17.60	30.70	23.80	A ₂ AH	87.20	1.80	3.90
5	3.12	6.10	20.00	64.10	19.60	30.50	25.80	A ₂ AH	84.00	1.50	8.20
6	4.84	8.70	29.00	59.90	18.00	30.00	22.10	A ₂ AH	86.40	1.40	4.00
7	4.20	7.60	25.60	61.00	18.10	29.70	26.20	A ₂ AH	79.80	2.00	3.80
8	3.78	7.00	25.60	67.70	18.50	27.30	24.90	A ₂ AH	85.50	1.10	5.60
9	5.43	9.10	29.10	53.60	16.80	31.30	25.20	A ₂ AH	86.10	1.60	4.00
10	4.96	8.80	29.70	59.90	17.70	29.60	23.50	A ₂ AH	89.40	1.30	2.50
11	4.58	9.10	28.80	62.90	19.90	31.60	30.30	A ₂ AH	89.40	1.00	4.00
12	5.97	9.50	30.90	51.80	15.90	30.70	23.30	A ₂ AH	89.80	1.70	2.00
13	3.86	8.40	26.80	69.40	21.80	31.30	23.00	A ₂ AH	87.60	2.00	2.50
14	5.01	9.60	31.20	62.30	19.20	30.80	25.30	A ₂ AH	91.60	1.30	1.90
15	5.56	9.40	29.60	53.20	16.90	31.80	21.40	A ₂ AH	88.40	1.40	2.80
16	4.01	8.00	26.50	66.10	20.00	30.20	25.30	A ₂ AH	87.20	1.00	4.70
17	4.90	9.90	32.90	67.10	20.20	30.10	23.50	A ₂ AH	88.80	1.20	5.30
18	5.89	9.50	29.70	50.40	16.10	32.00	25.60	A ₂ AH	90.00	1.70	2.50
19	5.45	9.70	31.10	57.10	17.80	31.20	22.90	A ₂ AH	87.80	1.80	4.40

Table 2 Hematological parameters, red blood cell indices, Hb typing and relative amounts of each Hb fraction from 28 HbH disease patients.
(Cont.)

No.	Hematological parameters							Hb typing			
	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	Hb type	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbH (%)
20	5.19	8.40	31.00	59.70	16.20	27.10	23.90	CSA ₂ AH	87.40	1.10	5.40
21	4.24	8.20	27.20	64.20	19.30	30.10	23.90	CSA ₂ AH	86.00	1.60	5.10
22	3.44	6.80	23.30	67.70	19.80	29.20	23.30	CSA ₂ AH	80.00	1.60	5.20
23	3.92	7.90	27.80	70.90	20.20	28.40	21.40	CSA ₂ AH	87.60	1.20	4.30
24	2.50	5.50	18.70	74.80	22.00	29.40	26.20	CSA ₂ AH	82.70	2.00	3.20
25	3.44	6.90	24.90	72.40	20.10	27.70	25.60	CSA ₂ AH	82.00	1.20	6.70
26	4.56	8.60	30.00	65.80	18.90	28.70	27.20	CSA ₂ AH	83.70	1.00	8.30
27	4.79	8.40	30.80	64.30	17.50	27.30	28.70	CSA ₂ AH	91.30	0.90	5.20
28	4.35	7.90	27.60	63.40	18.20	28.60	24.90	CSA ₂ AH	88.70	0.90	7.90

RBC: red blood cell; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width

Table 3 The results of HbH inclusion bodies examined in 30 healthy individuals and 28 HbH disease patients by three professional medical technologists.

Sample group (N)		Incubation time (30 mins)		Incubation time (120 mins)	
		Present	Absent	Present	Absent
Normal (30)	MT 1	0	30	0	30
	MT 2	0	30	0	30
	MT 3	0	30	0	30
HbH disease (28)	MT 1	28	0	28	0
	MT 2	28	0	28	0
	MT 3	28	0	28	0

Hb: Hemoglobin; MT: Medical technologist

Table 4 The percentage of red blood cells containing inclusion bodies obtained from 30 mins and 120 mins incubation time of 28 HbH disease patients.

Sample no.	Incubation time (30 mins)			Incubation time (120 mins)		
	Mean	SD	Min – Max	Mean	SD	Min – Max
1	43.76	11.40	33.72 – 56.15	39.29	8.21	32.72 – 48.50
2	39.03	2.72	36.21 – 41.64	40.66	5.34	34.63 – 44.81
3	32.24	10.39	24.49 – 44.05	34.95	8.13	29.44 – 44.29
4	22.43	14.39	10.96 – 38.58	14.51	2.47	12.40 – 17.22
5	32.00	3.60	29.34 – 36.09	28.77	3.73	25.14 – 32.60
6	15.28	6.92	8.13 – 21.95	14.96	6.41	7.78 – 20.11
7	10.57	2.13	8.86 – 12.96	10.26	4.34	5.25 – 12.76
8	53.58	5.83	47.05 – 58.24	42.42	18.31	21.29 – 53.69
9	22.72	3.66	19.35 – 26.61	20.71	1.59	18.96 – 22.08
10	44.14	2.13	41.68 – 45.45	34.77	8.82	25.00 – 42.15
11	71.84	3.12	69.50 – 75.38	66.54	14.79	49.63 – 77.02
12	21.54	2.90	19.18 – 24.78	19.81	1.52	18.05 – 20.69
13	41.07	3.75	36.77 – 43.64	43.36	1.17	42.53 – 44.70
14	37.12	3.95	32.78 – 40.52	30.63	1.24	29.37 – 31.84
15	14.38	1.22	13.21 – 15.65	14.42	0.88	13.41 – 15.00
16	65.88	0.54	65.25 – 66.23	55.98	1.14	55.00 – 57.23
17	36.16	1.60	34.95 – 37.97	28.08	1.27	26.96 – 29.46
18	16.50	3.28	13.50 – 20.00	14.01	1.93	12.40 – 16.15
19	5.30	1.25	4.49 – 6.74	4.95	0.91	4.25 – 5.98
20	80.19	1.88	78.08 – 81.67	72.97	15.36	55.50 – 84.35
21	49.88	6.39	42.63 – 54.71	53.62	4.68	50.45 – 58.99
22	70.04	1.67	68.70 – 71.91	65.32	1.67	63.61 – 66.94
23	74.89	0.89	73.88 – 75.55	70.71	1.47	69.25 – 72.18
24	31.42	1.62	30.19 – 33.25	25.71	2.98	23.48 – 29.09
25	80.01	1.09	78.84 – 81.01	75.82	0.92	74.93 – 76.76
26	60.57	2.23	58.13 – 62.50	57.03	1.17	55.85 – 58.18
27	78.92	1.49	77.20 – 79.83	67.27	2.86	64.04 – 69.49
28	71.99	1.18	70.73 – 73.08	69.62	2.49	67.60 – 72.40

Table 5 Percentage of red blood cells containing inclusion bodies. Data are presented as mean ± SD and min - max.

Group (N)	30 mins	120 mins	p-value
Normal (30)	0	0	-
Total HbH disease (28)	43.70 ± 23.55 (5.30 – 80.19)	39.90 ± 22.06 (4.95 – 75.82)	0.000
HbH (19)	32.92 ± 18.16 (5.30 – 71.84)	29.42 ± 16.26 (4.95 – 66.54)	0.002
HbH-CS (9)	66.44 ± 16.51 (31.42 – 80.19)	62.01 ± 15.40 (25.71 – 75.82)	0.012
p-value	0.000*	0.000*	

*compared HbH with HbH-CS

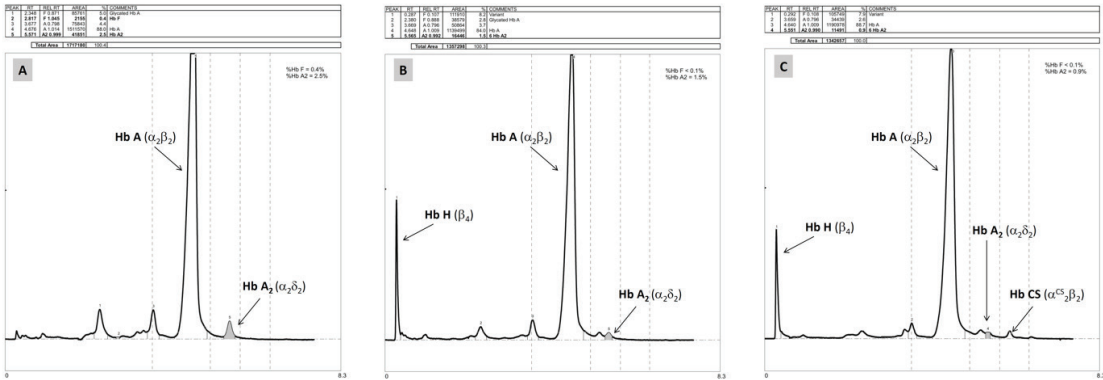


Fig. 1 Representative HPLC-chromatograms of healthy subjects (A), HbH disease (B) and HbH-CS disease (C).

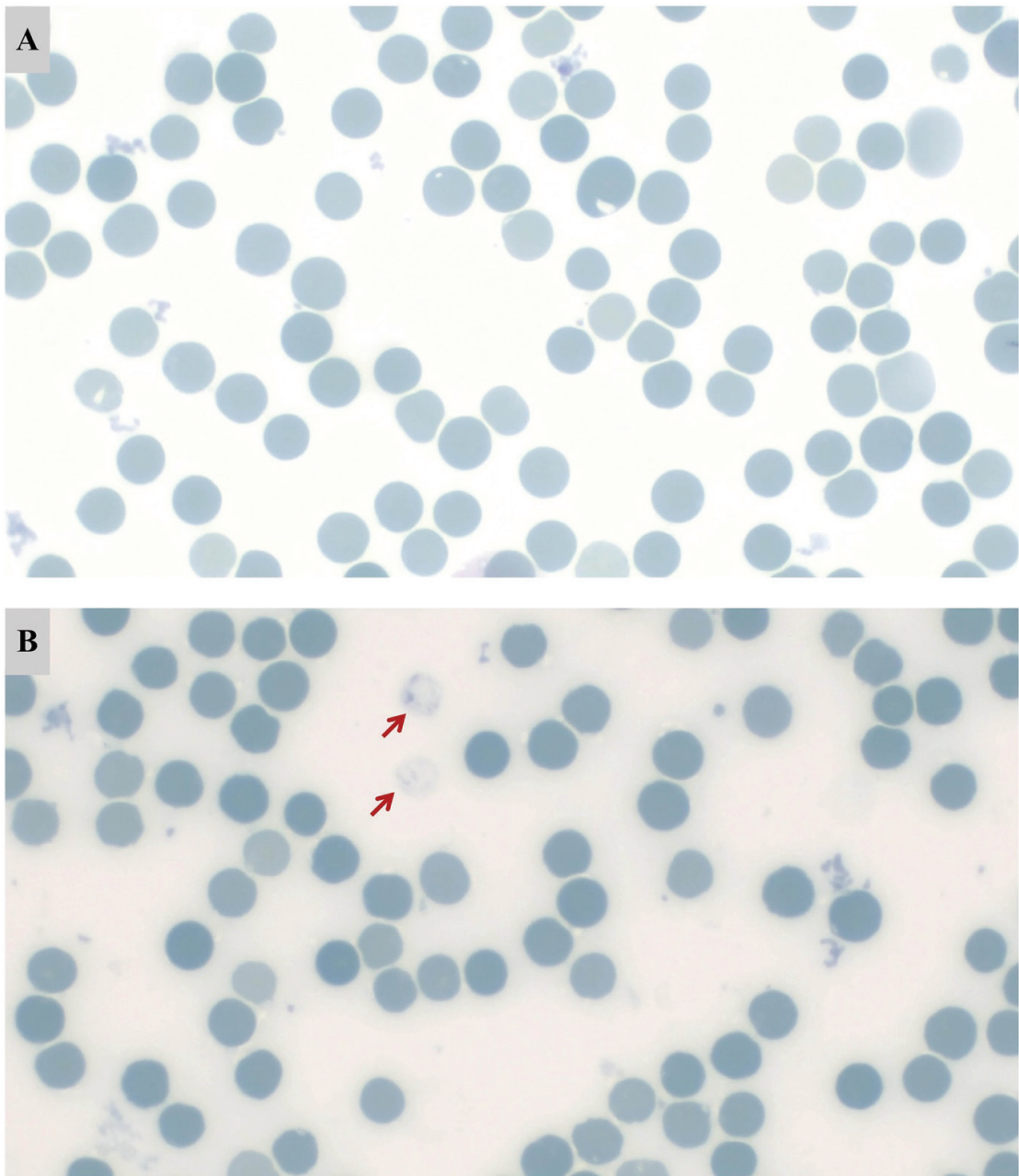


Fig. 2 Peripheral blood stained with 1% Brilliant cresyl blue in healthy subjects. Blood smears prepared after 30 min and 120 min of incubation time were illustrated in A and B, respectively. The red arrow indicates the leakage of hemoglobin, visible as faintly blue-stained erythrocytes.

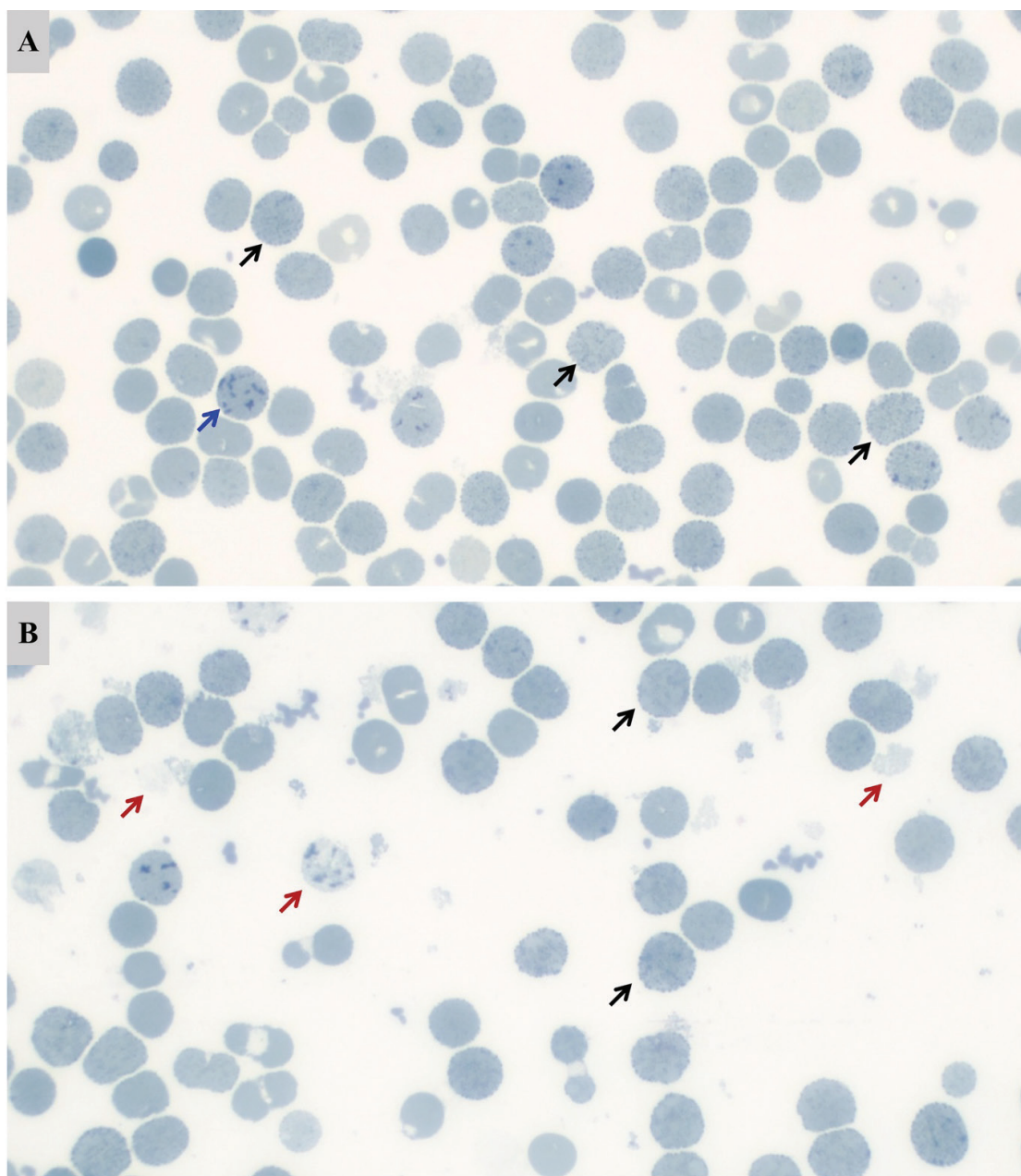


Fig. 3 Peripheral blood stained with 1% Brilliant cresyl blue in HbH disease samples. (A) demonstrated blood smears prepared after 30 min of incubation time. (B) demonstrated blood smears prepared after 120 min of incubation time. The black arrow indicates a 'golf ball'-like RBC containing an HbH inclusion body appearance compared with the surrounding normal red blood cells. The blue arrow indicates reticulocyte containing HbH inclusion body. The red arrow indicates the leakage of hemoglobin, visible as faintly blue-stained erythrocytes.

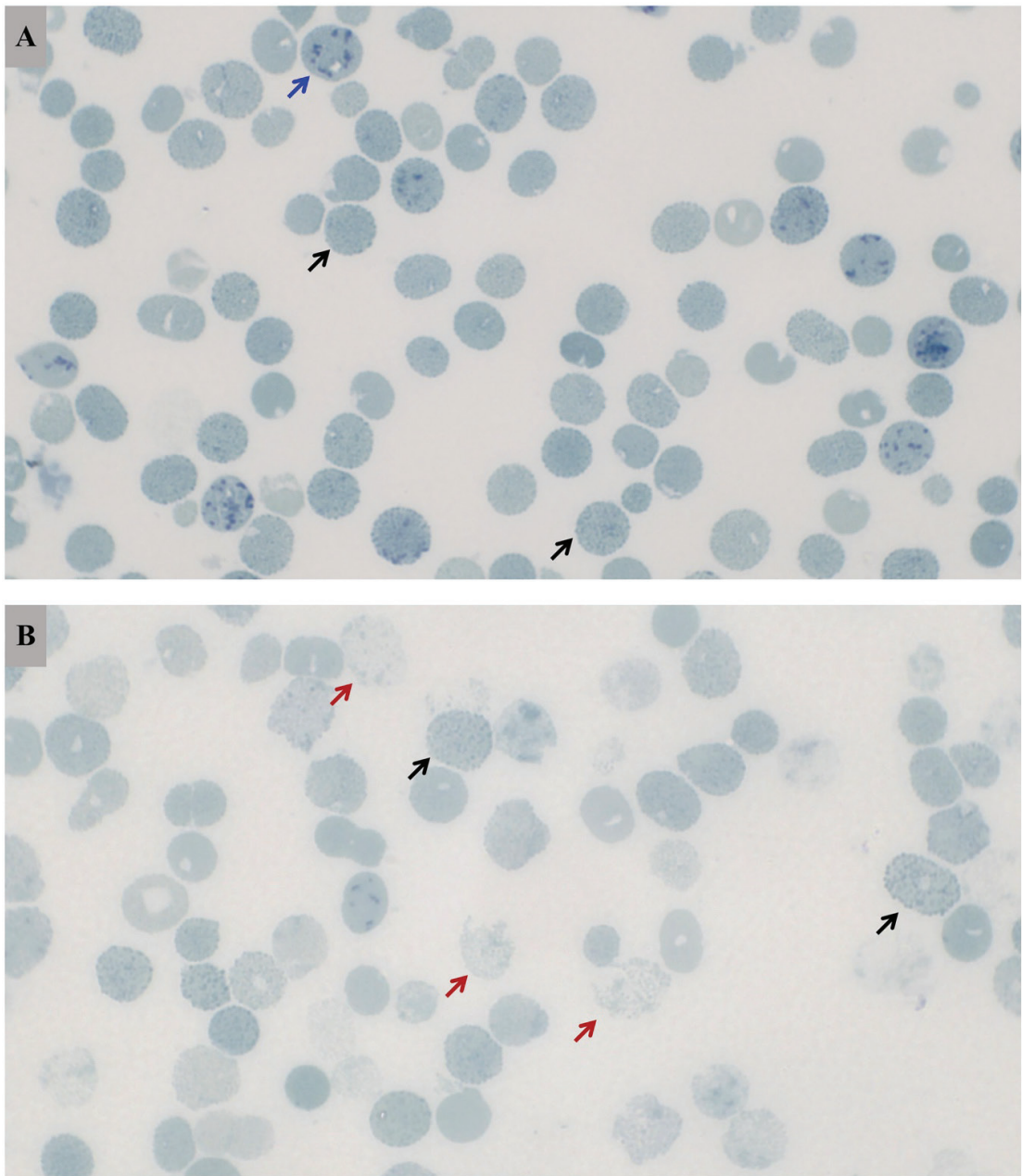


Fig. 4 Peripheral blood stained with 1% Brilliant cresyl blue in HbH-CS disease cases. (A) and (B) demonstrated blood smear prepared after 30 min and 120 min of incubation time, respectively. The black arrow indicates a 'golf ball'-like RBC containing an HbH inclusion. The blue arrow indicates reticulocyte containing HbH inclusion body. The red arrow indicates the leakage of hemoglobin in golf ball-like RBC, visible as faintly blue-stained.

วิจารณ์

การตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี (β₄) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการย้อมด้วย Brilliant cresyl blue จำเป็นต้องอ่านส่วนผสมระหว่างเลือดกับสีย้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ว่าเป็นระยะเวลาสั้น เพื่อให้เกิดกระบวนการออกซิไดซ์ HbH และตกตะกอนเป็นเม็ดกลมสีน้ำเงิน ระยะเวลาการอ่านที่ 1-3 ชั่วโมง ถูกแนะนำให้ใช้มากที่สุด เนื่องจากเพิ่มโอกาสให้ตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีได้มากขึ้น⁽¹⁰⁻¹⁴⁾ การทดสอบหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีด้วยสภาวะดังกล่าว มีประสิทธิภาพต่อการคัดกรองโรค HbH แต่มีความไวลดลงต่อการตรวจคัดกรองกลุ่มพาหะ α-thalassemia โดยเฉพาะพาหะ α-thalassemia 2 และ homozygous α-thalassemia 2⁽⁵⁾ มีหลายการศึกษาที่มีการพัฒนาวิธีการทดสอบให้มีความไวต่อการตรวจคัดกรองพาหะ α-thalassemia 1 และ α-thalassemia 2 ให้สูงขึ้น โดยการปั่นและเก็บส่วนบนสุดของชั้นที่เป็นเซลล์ (buffy coat) ไปทำการทดสอบ และเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อม นอกจากนี้ยังมีการปรับเพิ่มเวลาการย้อมให้นานขึ้น โดยสามารถเพิ่มความไวในการตรวจคัดกรองกลุ่มพาหะ α-thalassemia 1 ได้มากถึงร้อยละ 91-100^(6, 14)

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงผลของการปรับลดระยะเวลาการย้อม Brilliant cresyl blue ที่ 37 องศาเซลเซียส ให้เหลือเพียง 30 นาที ต่อการตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเซลล์เม็ดเลือดแดง ผลการศึกษาพบว่า การย้อม Brilliant cresyl blue ที่ 37 องศาเซลเซียส เพียง 30 นาที ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องทุกรายเมื่อเทียบกับผลการตรวจ Hb typing โดยไม่พบผลบวกและผลลบปลอม และสอดคล้องกับผลการย้อมที่ใช้เวลา 120 นาที โดยในกลุ่มตัวอย่างของคนปกติซึ่งมีชนิดฮีโมโกลบินเป็น A₂A ปริมาณ HbA₂

และค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงอยู่ในช่วงของคนปกติ^(15, 16) ตรวจไม่พบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีทุกราย (Table 3) ผลการตรวจสเมียร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตัวอย่างกลุ่มนี้จะพบเพียงเซลล์เม็ดเลือดแดงติดสีน้ำเงินของ Brilliant cresyl blue เนื่องจากสีดังกล่าวสามารถย้อมฮีโมโกลบินปกติได้ด้วยดังแสดงใน Fig. 2A อย่างไรก็ตามลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้จากการย้อมโดยใช้เวลา 120 นาที จะพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะคล้าย ghost cell (ติดสีน้ำเงินจาง) ได้จำนวนเล็กน้อย (Fig. 2B) เนื่องจากระยะเวลาการย้อมที่นานส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ อาจเกิดการรั่วของฮีโมโกลบินออกจากเซลล์ได้ ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยโรค HbH ซึ่งมีการปรากฏของ HbH fraction บนโครมาโตแกรมทุกราย⁽⁹⁾ ตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีทุกราย ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าการย้อม Brilliant cresyl blue ด้วยเวลาเพียง 30 นาที เพียงพอต่อการออกซิไดซ์ HbH ให้เป็นฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีภายในเซลล์ได้ โดยไม่ทำให้เกิดผลลบและผลบวกปลอมต่อการทดสอบ

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีที่ตรวจพบในกลุ่มผู้ป่วยโรค HbH พบว่า โรค HbH-CS ตรวจพบจำนวนที่มากกว่าในกลุ่มโรค HbH อย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก ทั้งการย้อมที่ใช้เวลา 30 และ 120 นาที (Table 5) สอดคล้องกับหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานพบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในโรค HbH (deletional HbH) ร้อยละ 33-85 ในขณะที่พบร้อยละ 52-95 ในโรค HbH-CS^(4, 14) แสดงให้เห็นว่าการย้อมโดยใช้เวลา 30 นาที ยังคงประสิทธิภาพการตรวจได้ไม่ต่างไปจากเดิม นอกจากนี้จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีที่ใช้เวลา 30 นาที ตรวจนับจำนวนได้

มากกว่าการย้อมที่ใช้เวลา 120 นาที เมื่อวิเคราะห์แยกตามชนิดของโรค HbH ก็ยังพบว่าการย้อมที่ใช้เวลา 30 นาที ตรวจนับจำนวนเซลล์ดังกล่าวได้มากกว่าการย้อมที่ใช้เวลา 120 นาที (Table 5) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้เมื่อย้อมเป็นเวลานานได้ เป็นผลทำให้จำนวนเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณลดลง สังเกตได้จากลักษณะของเซลล์บนสเมียร์เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเป็นลักษณะคล้าย ghost cell เป็นจำนวนมาก (Fig. 3B และ 4B) โดยเซลล์ติดสีจางมองเห็นฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ไม่ชัดเจนในบางเซลล์อินคลูชันบอดี้มีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดใหญ่ ติดสีน้ำเงินเข้มกว่าปกติ คล้ายกับการตรวจในเลือดที่เจาะเก็บไว้นานแล้ว (aged specimen) ซึ่งฮีโมโกลบินปกติเกิดการเสื่อมสลายและถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงว่ามีการเสื่อมสลายของเซลล์เกิดขึ้น รวมทั้งมีการเสื่อมสลายของฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ภายในเซลล์ด้วย ลักษณะของเซลล์ดังกล่าวอาจส่งผลให้ผู้ตรวจสเมียร์สังเกตและจำแนกเซลล์เหล่านั้นได้ยากด้วย ดังนั้นการย้อมสี Brilliant cresyl blue ไว้เป็นเวลานาน ถึงแม้จะช่วยให้เกิดการออกซิไดซ์ของ HbH ได้มากขึ้น และมองเห็นเม็ดตะกอนอินคลูชันบอดี้ภายในเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น (Fig. 3B และ 4B) แต่ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ได้มากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งอาจจะนำไปสู่การเกิดผลลบปลอมได้ในผู้ป่วยที่มีปริมาณเซลล์ดังกล่าวจำนวนน้อย

นอกจากนี้สี Brilliant cresyl blue ยังมีคุณสมบัติย้อมเซลล์ขณะที่มีชีวิต (supravital stain) ได้ ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดแดง reticulocyte จึงถูกย้อมติดสีน้ำเงินด้วยและไรโบโซม หรือ RNA ที่ยังพบอยู่ในไซโตพลาสซึม ก็จะตกตะกอนสานกันเป็นร่างแหติดสีน้ำเงินเข้ม (Fig. 3A, blue arrow) ดังนั้น

หาก reticulocyte มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ อยู่ภายในเซลล์ด้วย ก็จะเห็นตะกอนเม็ดกลมสีน้ำเงินร่วมด้วยเช่นกัน ดัง Fig. 3 และ 4 ซึ่ง reticulocyte จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยโรค HbH ด้วย ดังนั้นจะมีโอกาสพบเซลล์ดังกล่าวจำนวนมากในสเมียร์เลือด ผู้ตรวจสเมียร์เลือดจึงจำเป็นต้องมีการสังเกตและพิจารณาอย่างถี่ถ้วนเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำ ดังนั้นการตรวจสเมียร์เลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์จำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการจำแนกเซลล์มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ และ reticulocyte ในขั้นตอนการผสมสีย้อมกับเลือด ควรเขย่าให้เข้ากันทั้งก่อนและหลังการอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เพราะการตั้งหลอดผสมเลือดกับสีไว้เป็นเวลานานจะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอนอยู่ด้านล่างได้ ดังนั้นหากไม่มีการเขย่าให้เข้ากันก่อนเตรียมสเมียร์เลือดจะทำให้มีผลต่อการตรวจนับจำนวนได้

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบ Artificial Intelligent (AI) เข้ามาช่วยในการตรวจหาเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้บนสเมียร์ โดยผลจากการศึกษาพบว่ามีความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเซลล์ดังกล่าวสูงถึงร้อยละ 91 และ 99 ตามลำดับ⁽¹⁶⁾ โดยสามารถตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ได้ถึงแม้จะมีจำนวนเซลล์เพียง 1 ใน 100,000 ดังนั้นในอนาคต หากมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดังกล่าว ร่วมกับการปรับลดเวลาย้อมตามการศึกษาค้างนี้ จะช่วยให้การตรวจหาเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดี้ทำได้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถลดระยะเวลาความผิดพลาดในการตรวจและจำแนกเซลล์ รวมถึงกำลังคนได้ด้วย อีกทั้งอาจจะช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะต่อการคัดกรองพาหะ α -thalassemia 1 ได้อีกด้วย

สรุป

การปรับลดเวลาการย้อม Brilliant cresyl blue เป็นเวลา 30 นาที ให้ผลการตรวจสอบคล้อยกับการย้อมที่ใช้เวลา 120 นาที โรค HbH ทุกรายไม่พบผลบวกและผลลบปลอม และตรวจพบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีได้สูงกว่า 120 นาที ดังนั้นการย้อมด้วยเวลาดังกล่าวสามารถตรวจหาฮีโมโกลบินเอชอินคลูชันบอดีในเม็ดเลือดแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาการตรวจและการรอคอยผลได้ ส่งผลให้แพทย์ได้ผลการตรวจที่เร็วขึ้น สามารถให้การวินิจฉัยและวางแผนการรักษาผู้ป่วยได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษานี้ (ทุนวิจัยเลขที่ AHS-RD-66007) ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สิทธิชัย ปัญญาใส อาจารย์ประจำภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้คำปรึกษาในการเก็บและการวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนการเขียนต้นฉบับขอขอบคุณ บริษัท ไบโอเซน จำกัด ที่สนับสนุนเครื่องมือและน้ำยาสำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

เอกสารอ้างอิง

- Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 13.
- Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ* 2008; 86: 480-7.
- Wickramasinghe SN, Hughes M, Higgs DR, *et al.* Ultrastructure of red cells containing haemoglobin H inclusions induced by redox dyes. *Clin Lab Haematol* 1981; 3: 51-60.
- Adirojnanon P, Wasi P. Levels of haemoglobin H and proportions of red cells with inclusion bodies in the two types of haemoglobin H disease. *Br J Haematol* 1980; 46: 507-9.
- Galanello R, Paglietti E, Melis MA, *et al.* Hemoglobin inclusions in heterozygous alpha-thalassemia according to their alpha-globin genotype. *Acta Haematol* 1984; 72: 34-6.
- Pan LL, Eng HL, Kuo CY, *et al.* Usefulness of Brilliant cresyl blue staining as an auxiliary method of screening for alpha-thalassemia. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 94-7.
- Lafferty JD, Barth DS, Sheridan BL, *et al.* A multicenter trial of the effectiveness of zeta-globin enzyme-linked immunosorbent assay and hemoglobin H inclusion body screening for the detection of alpha⁰-thalassaemia trait. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 309-15.
- Chan AY, So CK, Chan LC. Comparison of the HbH inclusion test and a PCR test in routine screening for alpha thalassaemia in Hong Kong. *J Clin Pathol* 1996; 49: 411-3.

9. Turley E, McFarlane A, Halchuk L, *et al.* Hemoglobin H identification by high-performance liquid chromatography in confirmed hemoglobin H disease. *Int J Lab Hematol* 2015; 37: 668-72.
10. Wild BJ, Bain BJ. Investigations of abnormal haemoglobins and thalassemia. In: Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th ed, Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 2011: 301-32.
11. Kuptamethi S, Pravatmuang P, Fucharoen S, *et al.* Modified technique for detecting red cells containing inclusion bodies in alpha-thalassemia trait. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1987; 23: 213-21.
12. Maungsapaya W, Winichagoon P, Fucharoen S, *et al.* Improved technic for detecting intraerythrocytic inclusion bodies in alpha thalassemia trait. *J Med Assoc Thai* 1985; 68: 43-5.
13. Sabath DE, Cross ST, Mamiya LY. An improved method for detecting red cells with hemoglobin H inclusions that does not require glass capillary tubes. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 87-91.
14. Satthakarn S, Panyasai K, Phasit A, *et al.* Reliability of hemoglobin A2 value as measured by the Premier Resolution system for screening of β -thalassemia carriers. *Clin Chem Lab Med* 2023; 62: 453-63.
15. Wongkrajang P, Chinswangwatanakul W, Mookhamakkun C, *et al.* Establishment of new complete blood count reference values for healthy Thai adults. *Int J Lab Hematol* 2018; 40: 478-83.
16. Lee SY, Chen CME, Lim EYP, *et al.* Image analysis using machine learning for automated detection of hemoglobin H inclusions in blood smears - a method for morphologic detection of rare cells. *J Pathol Inform* 2021; 12: 18.