บทฟื้นฟูวิชาการ

การตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน Reticulocyte ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เลือดอัตโนมัติ

นวพรรณ จารุรักษ์

Charuruks N. Automated reticulocyte analysis. Chula Med J 1997 May;41(5): 389-400

The retculocyte count is one of the most valuable factors to assess bone marrow erythropoietic activity. Under physiologically normal conditions, the retculocytes mature in the bone marrow for about three days and subsequently in the blood circulation for an additional day until they are mature erythrocytes. Although the reticulocyte count is clinically valuable, its reliability is limited by both physiological and technical factors. The physiological factors include diurnal and daily variations in the bone marrow's mitotic activity. The technical factors relate to the laboratory procedures used to perform the count. These factors include distributional variability of reticulocytes in the blood smear, variations in staining techniques and quality, limited number of reticulocytes counted, and differences among scientists as to the criteria relevant for the identification of reticulocytes. The method most widely used is a microscopic count of reticulocytes per 1000 red cells. Aside from being labor-intensive, this method tends to be inaccurate and imprecise. Recent technological advances led the way to the development of blood cell analyzers capable of performing a rapid, accurate, precise, and complete analysis of circulating retculocytes and erythrocytes.

This discussion will review the current status of automated reticulocyte analysis and discuss the clinical utility of the reticulocyte count.

Key words : *Reticulocyte count, Automated Reticulocyte Analyzer.*

Reprint request : Charuruks N. Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

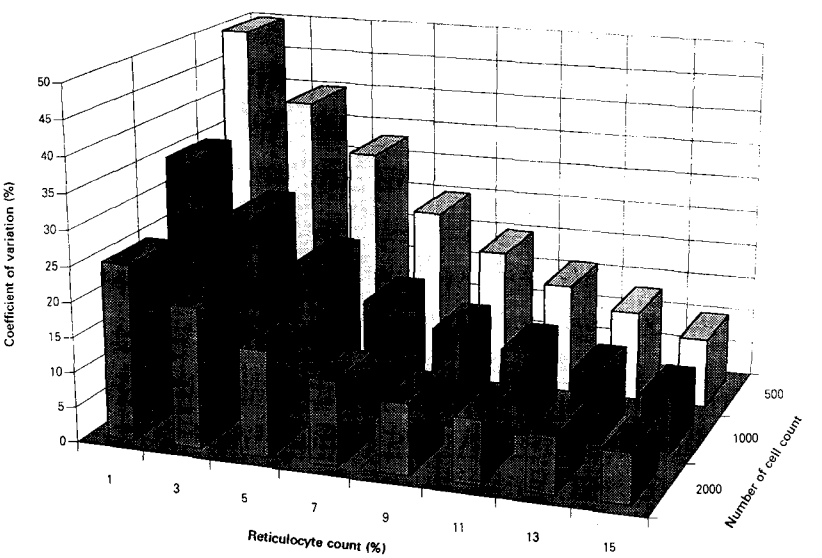
Received for publication. March 20,1997.

* ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte ค้นพบครั้งแรกในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะโลหิตจาง Ehrlich ปี ค.ศ. 1881 เรียกว่า "skein cell" และแพทย์ในสมัยนั้นเชื่อว่าเป็นเม็ดเลือดแดงที่กำลังแก่ตายหรือเสื่อมสลาย แต่จากการศึกษาในระยะต่อมาพบว่า reticulocyte สูงขึ้นในระยะหลังจากการเสียเลือดและหรือภาวะโลหิตจางในระยะที่ได้รับการรักษาแล้วและกำลังเริ่มเข้าสู่สภาวะปกติ จากการศึกษาเพิ่มขึ้นพบว่า reticulocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในระยะก่อนที่จะเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวแก่สมบูรณ์ ปริมาณหรือจำนวน reticulocyte จึงถูกนำมาใช้บอกความสามารถของไขกระดูกในการสร้างเม็ดเลือดแดง[1-2]

การตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte มีความสำคัญทางการแพทย์ด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ 1.) ช่วยในการแบ่งชนิดภาวะโลหิตจางตามกลไกการเกิด กล่าวคือ ภาวะโลหิตจางที่เกิดความผิดปกติที่ไขกระดูก หรือมีการสร้างเม็ดเลือดแดงลดลงจะมีปริมาณหรือจำนวน reticulocyte ลดลง ในขณะที่ภาวะโลหิตจางที่เกิดจากการสูญเสียเลือด หรือการแตกทำลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีปริมาณหรือจำนวน reticulocyte สูงขึ้น[3] 2.) ช่วยในการติดตามผลการรักษาภาวะโลหิตจาง เช่น ในการรักษาภาวะโลหิตจางที่เกิดจากการขาด B12[4], folic acid[4], เหล็ก[5] หรือ erythropoietin (EPO)[6] เป็นต้น ซึ่งหลังจากได้รับการรักษาแล้วการสร้างเม็ดเลือดแดงในไขกระดูกจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและกลับสู่สภาพปกติในที่สุด นอกจากนี้ยังใช้ในการติดตามผลการปลูกถ่ายไขกระดูก[7] เป็นต้น

การตรวจนับจำนวน reticulocyte ที่ทำกันอย่างแพร่หลายก็คือ การตรวจนับด้วยการย้อมตัวอย่างเลือดด้วยสี supravital stain ไถสไลด์เลือด และทำการตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดง 1000 เซลล์ แล้วรายงานค่า reticulocyte เป็นร้อยละ[8] วิธีการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายสูงมาก มีผู้รายงานว่าสูงถึงร้อยละ 25 จนสูงกว่าร้อยละ 50 ซึ่งแสดงถึงความถูกต้องแม่นยำต่ำ[9-11] (รูปที่ 1) ในปัจจุบันเทคโนโลยีมีความเจริญก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว มีการผลิตเครื่องอัตโนมัติที่สามารถตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte ที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง[9, 12-13]



รูปที่ 1 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนด้วยวิธี manual method นั้นมีค่า CV (%) สูง โดยเฉพาะเมื่อนับเซลล์จำนวนน้อย และเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนมีจำนวนน้อย

การพัฒนาเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte

เครื่องอัตโนมัติในการตรวจวิเคราะห์เลือดเริ่มจาก Moldavan ค.ศ. 1934[14] ได้เสนอความคิดในการประดิษฐ์เครื่องอัตโนมัติในการตรวจวิเคราะห์เลือดเป็นครั้งแรก โดย Moldavan ได้กล่าวถึงการนับเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในสภาพที่ไหลไปตามการไหลของของเหลวด้วยเครื่องอัตโนมัติ โดยการให้เซลล์เม็ดเลือดแขวนลอยอยู่ในสารละลายและบังคับให้สารละลายไหลไปตามหลอดแก้วเล็กๆ ผ่านเลนซ์ที่มีกำลังขยายสูงที่ได้ติดตั้งเครื่องตรวจนับเซลล์เม็ดเลือด ความคิดของ Moldavan ไม่สามารถประสบความสำเร็จได้ในขณะนั้นด้วยปัญหา 3 ประการ

1. ขนาดของหลอดแก้วซึ่งต้องมีขนาดเล็กมากและปัญหาการอุดตัน

2. สารละลายที่จะต้องเตรียมให้เซลล์เม็ดเลือดแขวนลอยและไหลตามหลอดแก้วเล็กๆ อยู่ตลอดเวลา

3. เครื่องตรวจนับที่มีความไวสูงและสามารถตรวจนับเซลล์ที่มีขนาดเล็กเช่นเซลล์เม็ดเลือดได้

ความคิดของ Moldavan เหมือนจินตนาการที่รอการพิสูจน์และได้รับการพิสูจน์ถึงความเป็นไปได้แล้วในปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ต่อมาอีกหลายคนได้ทุ่มเทแก้ปัญหา 3 ประการ คนสำคัญคือ Gucker และคณะในปี ค.ศ. 1947[15] ได้แก้ปัญหาข้อที่ 3 ของ Moldavan ได้สำเร็จ โดยการประดิษฐ์ Photoelectric counter เป็นคนแรก ในปี คศ. 1953 Crosland-Taylor[16] สามารถ แก้ปัญหาข้อที่ 1 และ 2 ของ Moldavan ได้สำเร็จ ด้วยทฤษฎี Laminar Flow นับแต่นั้นเครื่องตรวจวิเคราะห์เลือดอัตโนมัติก็ถูกประดิษฐ์ขึ้นและได้รับการพัฒนา มีการนำวิธีย้อมเซลล์มาใช้ร่วมเพื่อช่วยในการนับแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดแดงและขาวออกจากกัน อันเป็นต้นแบบของหลักการ Light Scattering และ Cytochemistry ในเวลาต่อมา รวมทั้งการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้ two-dimensional histogram ในปี ค.ศ. 1965 Meyer-Doering และ Knauer[17] ได้ประดิษฐ์เครื่องตรวจวิเคราะห์เลือดอัตโนมัติในตระกูล Technicon ขึ้นเป็นครั้งแรก และได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมาจนปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์อีกกลุ่มที่สำคัญคือ Wallace Coulter[18-19] ได้คิดหลักการ Aperture Impedance หรือ Electrical Impedance และประดิษฐ์เครื่องตรวจวิเคราะห์เลือดอัตโนมัติเพื่อการค้าขึ้นเป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1949 ใช้ชื่อว่า "Model A" Coulter Counter® Coulter ไม่เคยหยุดนิ่งและเดินหน้าพัฒนาเครื่องตรวจวิเคราะห์เลือดอัตโนมัติในตระกูล Coulter อย่างต่อเนื่องมาจนปัจจุบัน นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์อีกกลุ่มที่สำคัญคือ Mellors และ Silver ในปี ค.ศ. 1951[20] ได้นำสี fluorescence มาย้อมเซลล์เพื่อวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติที่ให้เซลล์ไหลไปตาม Flow cell ดังกล่าวมาแล้ว ร่วมกับหลักการ Light Scattering เป็นการเริ่มต้นของการเครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนอัตโนมัติในเวลาต่อมา และที่สำคัญเป็นการเริ่มต้นของเครื่อง Flow Cytometry ในปัจจุบัน

จากจินตนาการของนักวิทยาศาสตร์ในอดีตก่อให้เกิดการพัฒนาเครื่องอัตโนมัติในการตรวจวิเคราะห์เลือด ซึ่งปัจจุบันได้รับการพัฒนามาเป็นเครื่องอัตโนมัติในการตรวจวิเคราะห์เลือดที่สำคัญถึง 3 ชนิด คือ

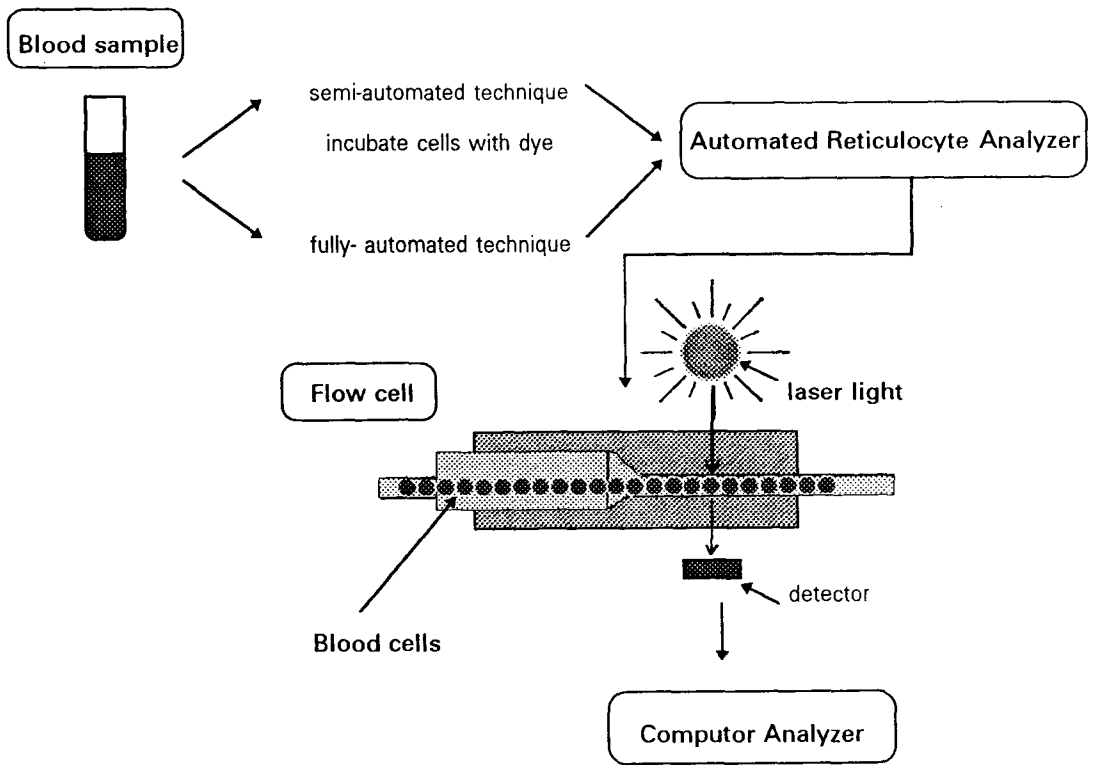
1. เครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Automated Blood Cell Analyzer)

2. เครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนอัตโนมัติ (Automated Reticulocyte Analyzer)

3. Flow Cytometry

หลักการของการตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนด้วยเครื่องอัตโนมัติ

หลักการของการตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนด้วยเครื่องอัตโนมัติก็คือหลักการที่กิดจากจินตนาการของ Moldavan[14] ตามที่กล่าวแล้วข้างต้นนั่นเอง กล่าวคือใช้สีที่สามารถย้อม nucleic acid ได้ ซึ่งอาจเป็น supravital stain หรือ fluorescence ก็ได้ ย้อม nucleic acid ที่อยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วให้เซลล์เม็ดเลือดแดงไหลเรียงเดี่ยวผ่านไปตามท่อ เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงถูกวิเคราะห์ด้วยแสง laser และตรวจจับสัญญาณการวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจจับสัญญาณ เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ และรายงานผลให้ผู้ใช้ทราบทางจอคอมพิวเตอร์และพิมพ์ใบรายงานผลถ้าต้องการ ข้อมูลเหล่านี้สามารถเก็บไว้ด้วยแผ่น disc เพื่อประโยชน์ในการเก็บข้อมูล (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ไดอะแกรมวิธีการตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte ด้วยเครื่องอัตโนมัติ การตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ปัจจุบันมี 2 แบบใหญ่ คือ เครื่อง semi-automated และ fully-automated method โดยวิธี semi-automated method นั้นต้องรอเวลาให้น้ำยาทำปฏิกิริยากับเลือดก่อนที่จะให้เครื่องทำการตรวจวิเคราะห์ เครื่องอัตโนมัติจะทำการวิเคราะห์โดยให้เซลล์เม็ดเลือดที่ทำปฏิกิริยากับสีย้อมแล้วไหลเรียงเดียวไปตาม flow cell ซึ่งมีแสง laser ใช้สำหรับวิเคราะห์เซลล์และมี detector รับสัญญาณการวิเคราะห์และส่งต่อสัญญาไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผลต่อไป

ปัจจุบันมีเครื่องอัตโนมัติที่ถูกผลิตขึ้นและจำหน่ายไปทั่วโลกโดยบริษัทต่างๆ หลายบริษัท แต่ละบริษัทมีหลักการและพัฒนาวิธีการไปตามแนวทางของตนเอง (ตารางที่ 1) ในประเทศไทยเรามีการนำเข้าเครื่องอัตโนมัติสำหรับการตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่สำคัญ 2 ประเภทใหญ่ๆ[21] คือ

1. เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนประเภทกึ่งอัตโนมัติ (Semi-automated Reticulocyte Analyzer)

2. เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนประเภทอัตโนมัติ (Fully-automated Reticulocyte Analyzer)

ตารางที่ 1 เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในปัจจุบัน

Instument	Manufacturer	Dye	Parameters
Technicon H*3	Miles Diagnostics	Oxazine 750	Ret. count (%), Low Medium and High Retic. (%), MCVr, CHCMr, CHr, RDWr, HDWr, CHDWr, RMI
MAXM, STKS	Coulter Electronics	New methylene blue	Ret. count (%), MCVr, RMI
Cell-Dyn 3500	Abbott	New methylene blue	Ret. count (%, #), RBC
Sysmex R series	TOA Medical Electronics	Auramine O	Ret. count (%, #), Low, Medium and High florescence intensity, RMI, RBC, WBC, Platelet
Advia 120	Miles Diagnostics	Oxazine 750	Ret. count (%), Low, Medium and High Retic. (%), MCVr, CHCMr, CHr, RDWr, HDWr, CHDWr, RMI
Cell-Dyn 4000	Abbott	Thiazole orange	Ret. count (%, #), RMI
Coulter Gen-S	Coulter Electronics	New methylene blue	Ret. count (%), MCVr, RMI
Flow cytometers	Becton Dickinson	Thiazole orange	Ret. count (%), RMI
Flow cytometers	Coulter Electronics	Thiazole orange	Ret. count (%), RMI
Flow cytometers	Ortho Diagnostics	Thiazole orange	Ret. count (%), RMI

นอกจากนี้การตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนนั้นยังสามารถกระทำโดยการใช้เครื่องมืออัตโนมัติอื่นๆ เช่น image analyzer, flow cytometer เป็นต้น แต่ไม่ได้รับความนิยมเพราะความไม่สะดวก ความซับซ้อน ใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง ต้องการผู้เชี่ยวชาญควบคุมการทำงานของเครื่องอัตโนมัติดังกล่าว และการอ่านผลมีความยุ่งยากซับซ้อน

เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนประเภทกึ่งอัตโนมัติ (Semi-automated Reticulocyte Analyzer)

หลักการ : เลือดจะต้องทำปฏิกิริยากับสีย้อมซึ่งเป็น supravital dye สีดังกล่าวนี้จะย้อมเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้จะต้องทำก่อนนำเลือดไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้จะใช้เวลาระยะหนึ่งแตกต่างกันไปได้ตั้งแต่ 5-90 นาที

ตัวอย่าง : Technicon H*3 (Miles Diagnostics, Bayer Co.), MAXM และ STKS (Coulter Electronics) Cell-Dyn 3500 (Abbott Co.) เป็นต้น

เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนประเภทอัตโนมัติ (Fully-automated Reticulocyte Analyzer)

หลักการ : เลือดจะถูกดูดเข้าไปในเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนอัตโนมัติ เลือดจะทำปฏิกิริยากับสีย้อมซึ่งเป็น supravital dye หรือ fluorescence dye สีดังกล่าวนี้จะย้อมเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้เกิดขึ้นภายในเครื่องอัตโนมัติในเวลาที่รวดเร็ว เครื่องอัตโนมัติดังกล่าวนี้สามารถวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในเวลาอันรวดเร็ว สะดวก ง่ายดาย

ตัวอย่าง : Sysmex R series (TOA Medical Electronics Co.), Advia (Miles Diagnostics, Bayer Co.), Cell-Dyn 4000 (Abbott Co.), CoulterGen-S (Coulter Electronics) เป็นต้น

การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ของเครื่องอัตโนมัติ

ปัจจุบันมีการนำค่า Reticulocyte count และค่า parameters ต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ของเครื่องอัตโนมัติมาใช้ประโยชน์ในทางคลินิก เนื่องจากเครื่องอัตโนมัติแต่ละแบบมีการรายงานค่า parameters เหล่านี้แตกต่างกันไป การทำความเข้าใจกับparameters เหล่านี้จึงมีความจำเป็นต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในทางคลินิก ทางการศึกษาค้นคว้าวิจัย และแน่นอนค่า parameters เหล่านี้ยังเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับผู้บริหารห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในการเลือกใช้เครื่องอัตโนมัติเพื่อให้สามารถตอบสนองความต้องการของแพทย์ และเพื่อประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าวิจัยอย่างคุ้มค่า ซึ่งจะเป็นการเลือกใช้เทคโนโลยีให้เหมาะสมและเกิดประโยชน์สูงสุดกับการพัฒนาประเทศ

Parameters ต่างๆที่รายงานจากเครื่องอัตโนมัติมีดังนี้

1. ค่านับจำนวน reticulocyte (reticulocyte count)[21]

เครื่องรายงานเป็นค่าร้อยละ (%) และ/หรือ ค่านับสัมบูรณ์ (#) เป็นค่าที่เครื่องอัตโนมัติส่วนใหญ่รายงาน

2. กลุ่มย่อย Sub-group of reticulocyte

เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนอัตโนมัติบางชนิดสามารถรายงานการตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนเป็นกลุ่มย่อยๆ ตามการติดสีที่ใช้ย้อม กลุ่มย่อยๆ เหล่านี้อธิบายการพัฒนาของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนจนเป็นตัวแก่ขึ้น และสามารถให้รายละเอียดของค่า reticulocyte maturation index (RMI) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาคุณค่าของค่า RMI และพบว่ามีประโยชน์ต่อการนำมาใช้ทางคลินิก การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดแดง และกำลังได้รับการศึกษาถึงประโยชน์อื่นๆ[21,22]

ตัวอย่างของกลุ่มย่อยๆ เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่รายงานโดยเครื่องอัตโนมัติ มีดังนี้ เช่น

Low fluorescence ratio (LFR), Medium fluorescence ratio (MFR), High fluorescence ratio (HFR) ที่รายงานโดยเครื่อง Sysmex R series โดยค่า LFR แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีความเจริญมากที่สุด และมี ribonucleic acid (RNA) เหลืออยู่น้อยที่สุด จึงทำปฏิกิริยากับสีย้อมได้ต่ำที่สุดในกลุ่ม ส่วน HFR แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีความอ่อนวัยมากที่สุดและมี ribonucleic acid (RNA) เหลืออยู่มากที่สุดจึงทำปฏิกิริยากับสีย้อมได้สูงที่สุดในกลุ่ม ในขณะที่ MFR แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีความเจริญอยู่ระหว่าง LFR และ HFR จึงทำปฏิกิริยากับสีย้อมอยู่ในระดับกลางของกลุ่ม ค่า MFR และ HFR สามารถแสดงสถานะของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่อ่อนวัยและเกิดเป็นค่าที่สามารถนำมาใช้ศึกษา immature reticulocyte ที่เรียกว่า "reticulocyte maturation index (RMI)" ได้[4,21,23]

เครื่อง Technicon H*3 สามารถรายงานเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนเป็นกลุ่มย่อยๆ ตามการติดสีได้ 3 กลุ่ม ได้เช่นกัน คือ Low-stained reticulocyte (L-Retic) แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีความเจริญมากที่สุดและมี ribonucleic acid (RNA) เหลืออยู่น้อยที่สุด เป็นกลุ่มที่มีการติดสี Oxazine 750 จางที่สุด ส่วน High-stained reticulocyte (H-Retic) แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีความอ่อนวัยมากที่สุดและมี ribonucleic acid (RNA) เหลืออยู่มากที่สุด จึงทำปฏิกิริยากับสีย้อมได้สูงที่สุดในกลุ่ม เป็นกลุ่มที่มีการติดสี Oxazine 750 เข้มที่สุด ในขณะที่ Medium-stained reticulocyte (M-Retic) แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีความเจริญอยู่ระหว่างกลุ่มทั้งสองจึงเป็นกลุ่มที่การติดสี Oxazine 750 อยู่ระหว่างกลุ่มที่มีการติดสี Oxazine 750 จางที่สุดและกลุ่มที่มีการติดสี Oxazine 750 เข้มที่สุด ค่า M-Retic และ H-Retic สามารถแสดงสถานะของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่อ่อนวัยและเกิดเป็นค่าที่สามารถนำมาใช้ศึกษา immature reticulocyte ที่เรียกว่า "reticulocyte maturation index (RMI)" ได้เช่นเดียวกัน[9,21]

อย่างไรก็ตามกลุ่มย่อยๆ เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่รายงานโดยเครื่องต่างชนิดกันมีความแตกต่างกันและไม่อาจนำมาทดแทนกันได้ เนื่องจากความแตกต่างกันของสีที่ใช้ และเทคโนโลยีที่แตกต่างกัน การนำมาใช้เปรียบเทียบกันจึงเป็นเรื่องที่จะต้องระมัดระวังอย่างมาก นอกจากนี้ค่า RMI ที่เกิดจากการรายงานของเครื่องที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกัน

3. ค่าดัชนีของ reticulocyte (reticulocyte indices)

ค่าดัชนี reticulocyte (reticulocyte indices) ปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นค่าที่ใช้ในงานวิจัยศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง เช่น มีการนำมาใช้จัดแบ่งชนิดของภาวะโลหิตจางต่างๆ[24-26] นอกจากนี้ยังมีการนำค่า MCVr มาใช้ติดตามผลการปลูกถ่ายไขกระดูก[27] เป็นต้น

ปัจจุบันเครื่องอัตโนมัติที่รายงานค่ากลุ่มนี้มีเครื่อง Technicon H*3[9,21] เครื่องอื่นๆ อาจรายงานได้บ้างมี MAXM และ STKS ซึ่งรายงานค่า MCVr ได้[21]

3.1 mean reticulocyte corpuscular volume (MCVr) คือ ค่าเฉลี่ยของขนาดของ reticulocyte มีหน่วยเป็น fL

3.2 mean reticulocyte corpuscular hemoglobin concentration (CHCMr) คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณฮีโมโกลบินต่อปริมาณของ reticulocyte มีหน่วยเป็น g/dL

3.3 mean reticulocyte hemoglobin content (CHr) คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์

reticulocyte แต่ละเซลล์ มีหน่วยเป็น pg

3.4 reticulocyte distribution width (RDWr) คือ ค่าความกว้างของการกระจายของขนาด reticulocyte มีหน่วยเป็น %

3.5 reticulocyte hemoglobin distribution width (HDWr) คือ ค่าความกว้างของการกระจายของปริมาณฮีโมโกลบิน reticulocyte มีหน่วยเป็น g/dL

3.6 reticulocyte corpuscular hemoglobin concentration distribution width (CHDWr) คือ ค่าความกว้างของการกระจายของปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์ reticulocyte มีหน่วยเป็น pg

การนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

ในปัจจุบันมีการนำมาใช้ประโยชน์ดังนี้

1. ศึกษาการสร้างเม็ดเลือดแดง ค่า reticulocyte count แสดงถึงสภาพของไขกระดูกในการผลิตเม็ดเลือดแดง ทำให้ทราบถึงจลน์ศาสตร์ของการสร้างเม็ดเลือดแดง และพบว่าในภาวะปกติจะมีการสร้างเม็ดเลือดแดงขึ้นทดแทนเม็ดเลือดแดงที่แก่และหมดอายุขัยไปถึงวันละประมาณ 61.40 x $10^3/\mu L$ (ranges 30.90-110.16 x $10^3/\mu L$) ในผู้หญิง และ 78.51 x $10^3/\mu L$ (ranges 37.15-144.75 x $10^3/\mu L$) ในผู้ชาย พบว่าการสร้างเม็ดเลือดแดงในผู้ชายสูงกว่าในผู้หญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าการสร้างเม็ดเลือดแดงในผู้ชายสูงกว่าในผู้หญิงถึงร้อยละ 27[28] ในทารกที่อยู่ในครรภ์นั้นพบว่าจลน์ศาสตร์ของการสร้างเม็ดเลือดแดงมีความแตกต่างๆ จากในผู้ใหญ่ กล่าวคือ พบว่าเมื่ออายุครรภ์ได้ 3 เดือน ตรวจพบ reticulocyte สูงถึงร้อยละ 90 และลดน้อยลงเมื่อมีอายุครรภ์มากขึ้น โดยพบว่ามีอายุครรภ์ 6 เดือน ตรวจพบ reticulocyte สูงถึงร้อยละ 15-30[25] และลดลงเป็นร้อยละ 3 เมื่อคลอด[29-30] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในภาวะโลหิตจางชนิดต่างๆ เช่น พบว่า ในภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็กมีค่า reticulocyte count ปกติ[4,31] ภาวะโลหิตจาง megaloblastic anemia มีค่า reticulocyte count ต่ำกว่าปกติ[22] ภาวะโลหิตจางจากการแตกทำลายเม็ดเลือดแดง มีค่า reticulocyte count[4,31] สูงกว่าปกติ ภาวะโลหิตจางจากไขกระดูกมาทำงานตามปกติ มีค่า reticulocyte count ต่ำกว่าปกติ[22,31] เป็นต้น

นอกจากนี้การใช้ประโยชน์จากกลุ่มย่อยๆ ของ reticulocyte โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า RMI ทำให้ความเข้าใจเรื่องการสร้างเม็ดเลือดแดงชัดเจนขึ้น การนำค่า reticulocyte indices มาช่วยในการวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงทำให้ทราบว่า เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte นั้นมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงตัวแก่ถึงร้อยละ 24 และมีปริมาณฮีโมโกลบินภายในเซลล์ต่ำกว่าเม็ดเลือดแดงตัวแก่ถึงร้อยละ 21[28] การศึกษานี้ช่วยให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte จนกระทั่งมาเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวแก่สมบูรณ์ และมีการนำมาใช้ในการศึกษาในภาวะผิดปกติต่างๆ ทำให้เกิดความเข้าใจในพยาธิสภาพของภาวะผิดปกติทั้งหลายกระจ่างขึ้น

2. ช่วยในการจัดแบ่งชนิดของภาวะโลหิตจางตามกลไกการเกิด[4,22,31] ประโยชน์ข้อนี้ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการศึกษาการสร้างเม็ดเลือดแดงในภาวะผิดปกติต่างๆ ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากความเข้าใจจลน์ศาสตร์ของการสร้างเม็ดเลือดแดงมาจัดแบ่งชนิดของภาวะโลหิตจางตามกลไกการเกิด ทำให้ทราบและเข้าใจพยาธิกำเนิดของการเกิดภาวะโลหิตจางชนิดต่างๆ มากขึ้น นอกจากนี้การนำค่า RMI เข้ามาช่วยในการศึกษา การสร้างเม็ดเลือดแดงนั้น ช่วยให้การจัดแบ่งชนิดของภาวะโลหิตจางต่างๆ ทำได้ดีขึ้น และเกิดความเข้าใจมากขึ้น ดังตัวอย่างที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

3. ช่วยในการติดตามการรักษาในผู้ป่วยภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็ก, โลหิตจางจากการขาดวิตามิน B_{12}, โลหิตจางการขาด folate[32,33] เพื่อดูการ

ตอบสนองของผู้ป่วยต่อการรักษามีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์กับผู้ป่วย หากไม่พบการตอบสนองต่อการรักษา จะได้ทำการค้นหาสาเหตุของความผิดปกติต่อไปจนกว่าผู้ป่วยจะได้รับการรักษาที่ถูกต้อง

4. ช่วยในการติดตามผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย erythropoietin (EPO) ความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทำให้สามารถใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรมผลิต recombinant erythropoietin (rEPO) ขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาภาวะโลหิตจางที่เกิดจากการขาด EPO เช่น ภาวะโลหิตจางที่เกิดจากไตวาย[34] ภาวะโลหิตจางที่เกิดจากโรคเรื้อรัง[35] ภาวะโลหิตจางที่เกิดในโรคมะเร็ง[36] เป็นต้น

5. ช่วยในการติดตามผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก การปลูกถ่ายไขกระดูกเป็นการรักษาที่ใช้ได้ผลดีในผู้ป่วย aplastic anemia ผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง acute และ chronic ผู้ป่วย lymphomas ผู้ป่วย myeloma ผู้ป่วย thalassemia major เป็นต้น การตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนมีความสำคัญกับการตรวจสอบความสำเร็จของการปลูกถ่ายไขกระดูก แม้ในความเป็นจริงแล้วตัวบ่งชี้ที่รวดเร็วกว่าคือ absolute neutrophil count (ANC)[37] และเกล็ดเลือด[38] แต่การตรวจวิเคราะห์ ANC และเกล็ดเลือดนั้นอาจเกิดปัญหาจากการได้รับเลือด และเกล็ดเลือดได้ ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนนั้นปลอดจากปัญหาดังกล่าว การตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในการติดตามผลการรักษาดังกล่าวจึงเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยม[39-42]

บทสรุป

ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไม่สามารถจะปฏิเสธความเปลี่ยนแปลงทางเทคโนโลยีที่เกิดขึ้นได้ ทำอย่างไรจึงจะใช้เทคโนโลยีอย่างเหมาะสมและคุ้มค่าจึงเป็นหัวใจสำคัญ เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนอัตโนมัติเป็นตัวอย่างหนึ่งของเทคโนโลยีที่กำลังก้าวเข้ามาแทนที่วิธีการแบบเก่าด้วยเหตุผลสำคัญ 2 ประการ คือ ประการแรก คือ ความถูกต้อง แม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว ของการตรวจวิเคราะห์ ประการที่สอง คือ ประโยชน์ที่จะได้รับชัดเจนขึ้นและมีมากมายดังบรรยายข้างต้น ผิดจากวิธีการแบบเก่าที่ยากต่อการสรุปผลการตรวจ ซึ่งเกิดจากการขาดความถูกต้อง แม่นยำ เป็นสำคัญ การเรียนรู้และทำความเข้าใจเทคโนโลยีจะก่อให้เกิดผลดีต่อการวางแผนและเลือกใช้เทคโนโลยีอย่างเหมาะสมและคุ้มค่า

อ้างอิง

1. Minot GR, Cohn RJ, Murphy WP, Lawson HA. Treatment of pernicious anemias with liver extract: effects upon the production of immature and mature red cells. Am J Med Sci 1928 May; 175: 599-622
2. Koepke JF, Koepke JA. Reticulocytes. Clin Lab Haematol 1986; 8(3): 169-79
3. McGrath JP. Assessment of hemolytic and hemorrhagic anemias in preclinical safety assessment studies. Toxicol Pathol 1993; 21(2): 158-63
4. Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu N, Ikeda Y, Houwen B. Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. J Clin Pathol 1994 Aug; 47(8): 736-9
5. Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, Mellroy W, Patterson C. Laboratory diagnosis of iron deficiency: an overview. J Gen Int Med 1992 Aar-Apr; 7(2): 145-53
6. Eschbach JW, Kelly MR, Haley NR, Abels RI,

Adamson JW. Treatment of the anaemia of progressive renal failure with recombinant human erythropoietin. N Engl J Med 1989 Jul; 321(3): 158-63

7. Arnold R, Schmeiser T, Heit W, Frickhofen N, Pabst G, Heimpel H. Hematopoietic reconstitution after bone marrow transplantation. Exp Hematol 1986 May; 14(4): 271-7
8. International Committe for Standardization in Haematology (ICSH). Guidelines for reticulocyte counting by microscopy on supravitally stained preparations. WHO/LBS/92.3, 1992
9. Buttarello M, Bulian P, Venudo A, Rizzotti P. Laboratory evaluation of the Miles H*3 automated reticulocyte counter: A comparative study with manual reference method and Sysmex R-1000. Arch pathol Lab Med 1995 Dec; 119(12): 1141-8
10. Savage RA, Skoog DP, Rabinovitch A. Analytic inaccuracy and imprecision in reticulocyte counting: a preliminary report from the College of American Pathologists Reticulocyte Prject. Blood Cells 1985; 11(1): 97-112
11. Peebles DA, Hochberg A, Clarke TD. Analysis of manual reticulocyte counting. Am J Clin Pathol 1981 Nov; 76(5): 713-7
12. Ferguson DJ, Lee SF, Gordon PA. Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in routine laboratory. Am J Hematol 1990 Jan; 33(1): 13-7
13. Schimenti KJ, Lacerna K, Wamble A, Maston L, Iaffaldano C, Straight M. Retculocyte quantification by flow cytometry, image analysis, and manual counting. Cytometry 1992; 13(8): 853-62
14. Moldavan A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. Science 1934 Aug; 80: 188-189
15. Gucker FT Jr, O'Konski CT, Pickard HB, Pitts JN Jr. A photoelectric counter for colloidal particles. J Am Chem Soc 1947; 69: 2442
16. Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. Nature (Lond) 1953; 171: 37-8
17. Meyer-Doering H, Knauer F. US Patent No. 3412254 "Apparatus for Counting Particles Suspended in Transparent Fluid" Filed June 4, 1965. Issued November 19, 1968
18. Coulter WH. US Patent No. 2656508 "Mean for Counting Particles Suspended in a Fluid" Filed Auaust 27, 1949. Issued October 20, 1953
19. Coulter WH. Hight speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. Prc Natl Electron Conf 1956; 12: 1034-42
20. Mellors Rc, Silver R. A microfluorometric scanner for the differential detection of cells: Application to exfoliative cytology. Science 1951 Oct; 114: 356-60
21. Davis BH, Bigelow NC. Automated reticu-

locyte analysis: Clinical practice and associated new parameters. Hematol/ Oncol Clin North Am 1994 Aug; 8(4): 617-30

22. Lin CK, Hsu HC, Chau WK, Jiang ML, Chiu CF. Reticulocyte count with maturation fractions in pancytopenic evaluation by a fully automated counter. J Clin Lab Analysis 1993; 7(6): 371-5
23. Brugnara C, Hipp MJ, Irving PJ, Lathrop H, Lee PA, Minchells EM. Automtated reticulocyte counting and measurement of reticulocyte cellular indices: evaluation of the Miles H*3 blood analyzer. Am J Clin Pathol 1994 Nov; 102(5): 623-32
24. Mohandas N, Johnson A, Wyatt J, et al. Automated quantitation of cell density distributin and hyperdense cell fraction in RBC disorders. Blood 1989 Jul; 74(1): 442-7
25. D'Onofrio G, Zini G Ricerca BM, Mancini S, Mango G. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and β-thalassemia trait. Arch Pathol Lab Med 1992 Jan; 116(1): 84-9
26. Bunyaratvej A, Butthep P, fucharoen S, Saw D. Erythrocyte volume and haemglobin concentration in haemoglobin H diease: Discrimination between the two genotypes. Acta Haematol 1992; 87(1-2): 1-5
27. D'Onofrio G, Chirillo R. Simultaneous H*3 RBC and reticulocyte measurement: Is it clinically useful? In: Balzac F, Chapman S, Verderese C, ed. H*3 New Perspectives For Hematology. Caduceus Medical Publishers, Inc., New York 1993: 23-7
28. Charuruks N, Limpanasithikul W, Voravud N, et al. Reference ranges and maturation of reticulocytes in adults. (in preparation)
29. Hillman RS, Finch CA. The missed reticulocyte. Br J Haematol 1969 Oct; 17(4): 313-5
30. Paterakis GS, Lykopoulou L, Papassotirou J, Stamulokatou A, Kattamis C, Loukopoulos D. Flow-cytometric nanlysis of reticulocytes in normal cord blood. Acta Haematologia 1993; 90(4): 182-5
31. Tsuda I, Tatsumi N. Maturity of reticulocytes in various hematological disorders. Eur J Haematol 1989 Sep; 43(3): 251-4
32. Brugnara C, Laufer MR, Friedman AJ, Bridges K, Platt O. retculocyte hemoglobin content (CHr): early indicator of iron deficiency and response to therapy. Blood 1994 May; 83(10): 3100-1
33. Spanish Multicentric Study Group for Haematopoietic Recovery. Flow cytometric reticulocyte quantification in the evaluation of hematologic recovery. Eur J Haematol 1994 Nov; 53(5): 293-7
34. Eschbach JW, Adamson JW. Recombinant haman erythropoietin: Implications for nephrology. Am J Kidney Dis 1988 Mar; 11(3): 203-9
35. Means R Jr, Olsen NJ, Krantz SB, Dessypris EN Graber SE Stone WJ. Treatment of the

anaemia of rheumatoid arthritis with recombnant human erythropoietin: clinical and in vitro studies. Arthritis Rheum 1989 May; 32(5): 638-42

36. Bukowaski RM. Clinical efficacy of recombinant human eryhtropoietin (EPO) in the treatment of the anemia associated with cancer. Erythropoiesis 1994; 88: 374-8
37. Arnold R, Schmeiser T, Heit W, Frickhofen N, Pabst G, Heimpel H. Hematopoietic reconstitution after bone marrow transplantation. Exp Haematol 1986 May; 14(4): 271-7
38. Thomas ED, Storb R, Fefer A, Slichter SJ, Bryant JI, Buckner CD. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. Lacet 1972 Feb; 1(745): 284-9
39. Davis BH, Bigelow N, Ball ED, Mills L, Gibbons GC 3rd. Utility of flow cytometric reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. Am J Hematol 1989 Oct; 32(2): 81-7
40. Davies SV, Cavill I, Bentley N, Fegan CD, Pynton CH, Whittaker JA. Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: Quantitative reticulocyte counting. Br J Haematol 1992 May; 81(1) 12-7
41. Kanold J, Bezou MJ, Coulet M, Quainon F, Malpuech G, Travade P, Demeocq F. Evaluation of eryhtropoietic/hematopoietic reconstitution after BMT by highly fluorescent reticulocyte counts compares favourably with traditional peripheral blood cell counting. Bone Marrow Transplant 1993 Apr; 11(4): 313-8
42. Greinix HT, Linkesch W, Keil F, Kalhs P, Schwarzinger I, Schneider B. Early detection of hematopoietic engraftment after bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation by highly fluorescent reticulocyte counts. Bone Marrow Transplant 1994 Aug; 14(2): 307-13