NU Science Journal 2008; 5(1): 43 - 53

การศึกษาผลกระทบของการเก็บรักษาเลือดต่อการทดสอบ one tube osmotic fragility test ในคนปกติและผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย

จิรภาส จงจิตวิมล ใหม่ จำปาศักดิ์ และอรทัย ตั้งวรสิทธิชัย*

Effects of blood storage for one tube osmotic fragility test in normal and thalassemia trait

Jirapas Jongjitwimol, Mai Jumpasuk and Orathai Tangvarasittichai*

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

*Corresponding author. E-mail: Orathai19t@yahoo.com

บทคัดย่อ

one tube osmotic fragility test (one tube OFT) เป็นวิธีที่ใช้ในการคัดกรองพาหะธาลัสซีเมีย โดยเม็ดเลือดแดงของผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมียจะแตกช้ากว่าเม็ดเลือดแดงของคนปกติ เมื่อเม็ดเลือดอยู่ในสารละลายเจือจาง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ ระยะเวลา และสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA และ heparin ที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างเลือด สำหรับการตรวจโดยวิธี one tube OFT ทั้งสามวิธี โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดของคนปกติ 10 ราย และผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย 10 ราย ซึ่งตัวอย่างเลือดทั้งหมดใส่สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA และ heparin อย่างละ 2 หลอด แล้วแยกเก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บไว้ในตู้เย็น (4-8 องศาเซลเซียส) เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี two minute OFT, five minute OFT และ overnight OFT ในชั่วโมงที่ 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 78 และ 96 ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า การใช้สารกันเลือดแข็งทั้งสองชนิดให้ค่าเฉลี่ยการตรวจวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P-value $>$ 0.05) ส่วนการใช้อุณหภูมิห้องหรือตู้เย็นในการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value $<$ 0.05) สรุปได้ว่าการเก็บรักษาเลือดเพื่อทำการทดสอบด้วยวิธี one tube OFT สามารถใช้สารกันเลือดแข็งได้ทั้งชนิด EDTA และ heparin โดยสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 15 ชั่วโมง หรือเก็บในตู้เย็นได้ไม่เกิน 54 ชั่วโมง ทั้งวิธี two minute OFT และ overnight OFT ส่วนวิธี five minute OFT สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 15 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ในตู้เย็นไม่เกิน 30 ชั่วโมง

คำสำคัญ: one tube osmotic fragility test , พาหะธาลัสซีเมีย, สารกันเลือดแข็ง, การเก็บรักษาเลือด

Abstract

One tube osmotic fragility test (one tube OFT) is the screening method for thalassemia trait detection. Red cells of thalassemia trait are less fragile than normal in hypotonic solution. There are many factors that influent the result of the test. Aim of this study was to investigate the effects of temperature, time and anticoagulant for blood storage on one tube OFT. Blood samples were collected from 20 volunteers consisted of 10 normal individuals and 10 subjects with thalassemia trait. Each blood samples were collected in 2 EDTA and 2 heparin tubes and then divided into 2 groups. The first groups of EDTA and heparin tubes were stored at room temperature and the second groups were stored in refrigerator that each blood sample was determined by two minute OFT, five minute OFT and overnight OFT at 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 78 and 96 hours, respectively. The means of osmotic fragility results were not significant different (P-value > 0.05) between using EDTA and heparin but they were significant different when compared at each temperature and each hour of storage (P-value < 0.05). In conclusion, one tube OFT can be performed on EDTA or heparinized blood. The blood should be determined within 15 hours at room temperature or within 54 hours at refrigerator storage by either two minute OFT or overnight OFT. However for five minute OFT, the blood samples should be determined within 15 hours at room temperature or within 30 hours at refrigerator storage.

Keywords : one tube osmotic fragility test, thalassemia trait, anticoagulant, blood storage

บทนำ

โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สายโกลบิน (globin chain) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ที่เป็นโปรตีนหลักในเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบินหลักในคนปกติประกอบด้วยสายโกลบิน 2 ชนิด คือ สายแอลฟาโกลบิน (α-globin) และสายบีตาโกลบิน (β-globin) เมื่อสายโกลบินมีการสังเคราะห์ในปริมาณที่ลดลงกว่าปกติหรือไม่สร้างเลย จะทำให้สายโกลบินที่มีการสร้างปกติมีปริมาณมากเกินสมดุล สายโกลบินที่เกินนี้ถ้ามีปริมาณมากจะทำให้เม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติและแตกง่าย ก่อให้เกิดอาการซีด เหลือง บางรายก่อให้เกิดตับโต ม้ามโตได้ (อานนท์ บุณยะรัตเวช, 2535) ทั้งนี้ความผิดปกติของการสังเคราะห์สายโกลบินไม่ได้มีเพียงด้านปริมาณเท่านั้น ยังมีความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของสายโกลบิลอีกด้วยหรือที่เรียกว่า ฮีโมโกลบินผิดปกติ (abnormal hemoglobin)

ซึ่งฮีโมโกลบินผิดปกติบางชนิดส่งผลทำให้การสร้างสายโกลบินลดลงเช่นเดียวกับโรคธาลัสซีเมีย เช่น ฮีโมโกลบินอี (hemoglobin E; Hb E) และ Hemoglobin Constant Spring (Hb CS) เป็นต้น

โรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติสามารถจำแนกได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับความผิดปกติของยีนธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรงหรือพาหะที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมีย (α-thalassemia trait) บีตาธาลัสซีเมีย (β-thalassemia trait) และฮีโมโกลบินอี (Hb E trait) ซึ่งเป็นพาหะของการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้ ส่วนธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย คือ โรคทารกบวมน้ำ (Hb Bart's hydrops fetalis) โรคโฮโมไซกัสบีตาธาลัสซีเมีย (homozygous β-thalassemia) โรคบีตาธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบินอี (β-thalassemia/Hb.E) และโรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) จากสถิติกระทรวงสาธารณสุขได้รายงานความชุกของการเกิดโรค พบว่าในคนไทยมีผู้ที่เป็นพาหะของโรคนี้ประมาณร้อยละ 30 – 40 และมีผู้ป่วยโรคนี้ประมาณร้อยละ 1 หรือประมาณ 600,000 ราย ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยธาลัสซีเมียประมาณ 5,000-6,000 ล้านบาทต่อปี (ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2541; วิชัย เหล่าสมบัติ, 2541)

ในรายที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย (thalassemia trait) จะไม่มีอาการทางคลินิกอย่างเด่นชัด เนื่องจากมีความผิดปกติของยีนเพียงตัวใดตัวหนึ่ง แต่หากคู่สมรสมียีนผิดปกติทั้งคู่ มีโอกาสที่ลูกบางคนอาจจะได้รับยีนผิดปกติตั้งแต่สองยีนขึ้นไป ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้ถึงร้อยละ 25

ดังนั้นการตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจคัดกรอง (screening test) เพื่อค้นหาผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย เช่น การดูค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (red blood cell indices) การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง (osmotic fragility test; OFT) เป็นต้น ถ้าได้ผลบวกจากการตรวจกรองต้องทำการตรวจยืนยัน (confirmatory test) โดยวิธีมาตรฐานต่อไป

one tube osmotic fragility test (one tube OFT) เป็นวิธีการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง โดยทดสอบความสามารถของเม็ดเลือดแดงในการดูดซึมน้ำเข้าเซลล์ โดยที่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเมื่ออยู่ในสารละลายเจือจาง ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทดสอบ เช่น ปริมาตร พื้นที่ผิว และความเข้มข้นของสารในเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นต้น เม็ดเลือดแดงที่มีสัดส่วนของปริมาตรต่อพื้นที่ผิวลดลง เช่น target cell และ hypochromia เป็นต้น จะแตกช้ากว่าปกติ พบได้ในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย (Kattamis *et al,*. 1981)

จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ one tube OFT เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย ที่นิยมทำกันมี 3 วิธี คือ 1) two minute OFT 2) five minute OFT และ 3) overnight OFT โดยใช้เลือดครบส่วน (whole blood) เป็นตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องใช้สารกันเลือดแข็ง (anticoagulant) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด heparin เป็นสารกันเลือดแข็งที่เหมาะสำหรับใช้ในการทดสอบ osmotic fragility แต่เป็นสารกันเลือดแข็งที่มีราคาค่อนข้างแพง ในห้องปฏิบัติการ

โลหิตวิทยาส่วนใหญ่นิยมใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด เช่น การตรวจความสมบูรณ์ของเลือด (complete blood count) เป็นต้น (สุนารี องค์เจริญใจ, 2540) ถ้าใช้เลือดเดียวกันนี้จะเป็นการลดจำนวนการเจาะเลือดลง อีกทั้งการตรวจด้วยวิธี one tube OFT ต้องใช้เลือดที่เจาะใหม่มาทำการทดสอบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ ระยะเวลา และสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA และ heparin ที่ใช้ในการเก็บรักษาเลือด เพื่อรักษาสภาพตัวอย่างเลือดให้มีคุณภาพใกล้เคียงกับเลือดที่เจาะใหม่และยังคงให้ผลการตรวจ one tube OFT ที่ถูกต้อง

วิธีการ

ทำการเจาะเลือดจากกลุ่มตัวอย่างจำนวน 6 มิลลิลิตร โดยกลุ่มตัวอย่างเป็นนิสิต คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 20 ราย แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 10 ราย ได้แก่ กลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย ซึ่งได้รับการตรวจยืนยันแล้วว่าไม่เป็นและเป็นพาหะธาลัสซีเมียตามลำดับ การตรวจยืนยันว่าเป็นหรือไม่เป็น α-thalassemia trait, β-thalassemia trait และ Hb E trait ใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis และ microcolumn chromatography ตามลำดับ ณ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ และภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยแบ่งเป็น 1) ศึกษาผลของสารกันเลือดแข็ง โดยแบ่งตัวอย่างเลือด 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มี EDTA จำนวน 2 หลอด และหลอดทดลองที่มี heparin จำนวน 2 หลอด 2) ศึกษาอุณหภูมิในการเก็บตัวอย่างเลือด โดยเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดทดลองที่มี EDTA และ heparin อย่างละ 1 หลอด ไว้ที่อุณหภูมิห้องและหลอดที่เหลือเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิระหว่าง 4 – 8 องศาเซลเซียส 3) ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด โดยทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดทั้ง 4 หลอด ในชั่วโมงที่ 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 78 และ 96 ตามลำดับ (รูป 1) ด้วยวิธี one tube OFT ทั้งสามวิธี ซึ่งมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

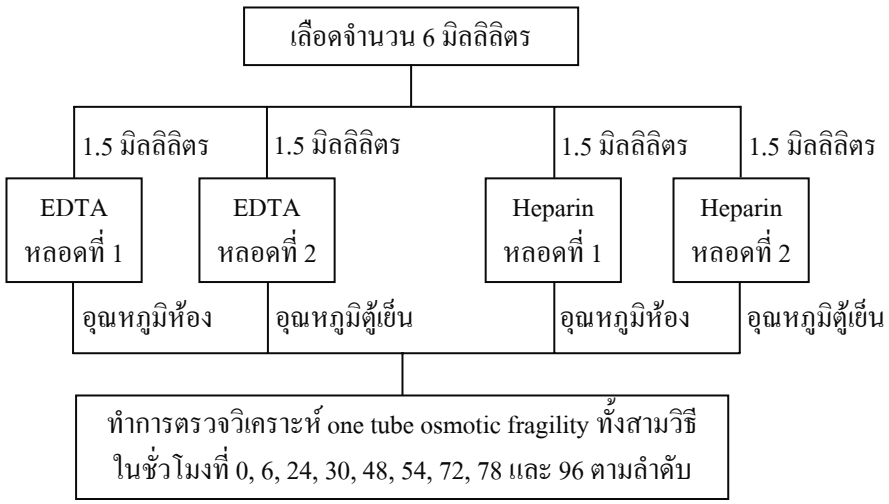
วิธี two minute OFT ใช้ packed red cell 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 0.42% glycerin saline buffer solution 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยวัด OD_1 และ OD_2 เมื่อเวลาครบ 15 และ 120 วินาที ตามลำดับ คำนวณหาร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง

สูตรคำนวณร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง (%Hemolysis) = $\frac{(OD_1 - OD_2)}{OD_1} \times 100$

วิธี five minute OFT ใช้ packed red cell 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 0.36% saline buffer solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นวัดค่า OD_1 ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ในทำนองเดียวกันใช้ packed red cell 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ 5 นาที เมื่อครบเวลา วัดค่า OD_2 คำนวณหาร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง

สูตรคำนวณร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง (%Hemolysis) = $\frac{OD_1}{OD_2} \times 100$

วิธี overnight OFT ทำการตรวจเช่นเดียวกับวิธี two minute OFT แต่การรายงานผลได้จากการสังเกตการแตกของเม็ดเลือดแดงภายหลังการตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ข้ามคืน



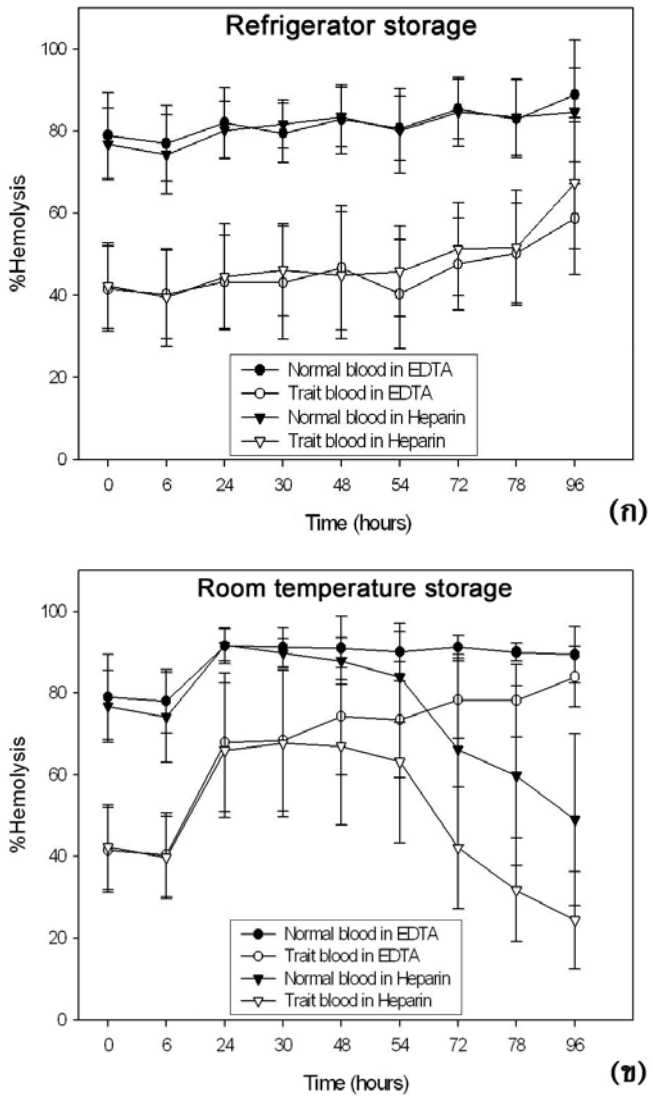
รูป 1 ขั้นตอนการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติ One-way ANOVA ที่ใช้ในการวิเคราะห์ระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างเลือด ทั้งที่ใช้ EDTA และ heparin ซึ่งตรวจด้วยวิธี two minute OFT และ five minute OFT ทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บในตู้เย็น ส่วนวิธี overnight OFT ใช้สถิติไคสแควร์ (chi-square test) สำหรับการวิเคราะห์ความแตกต่างของประสิทธิภาพการตรวจทั้งวิธี two minute OFT, five minute OFT และ overnight OFT ใช้สถิติไคสแควร์ เช่นกัน

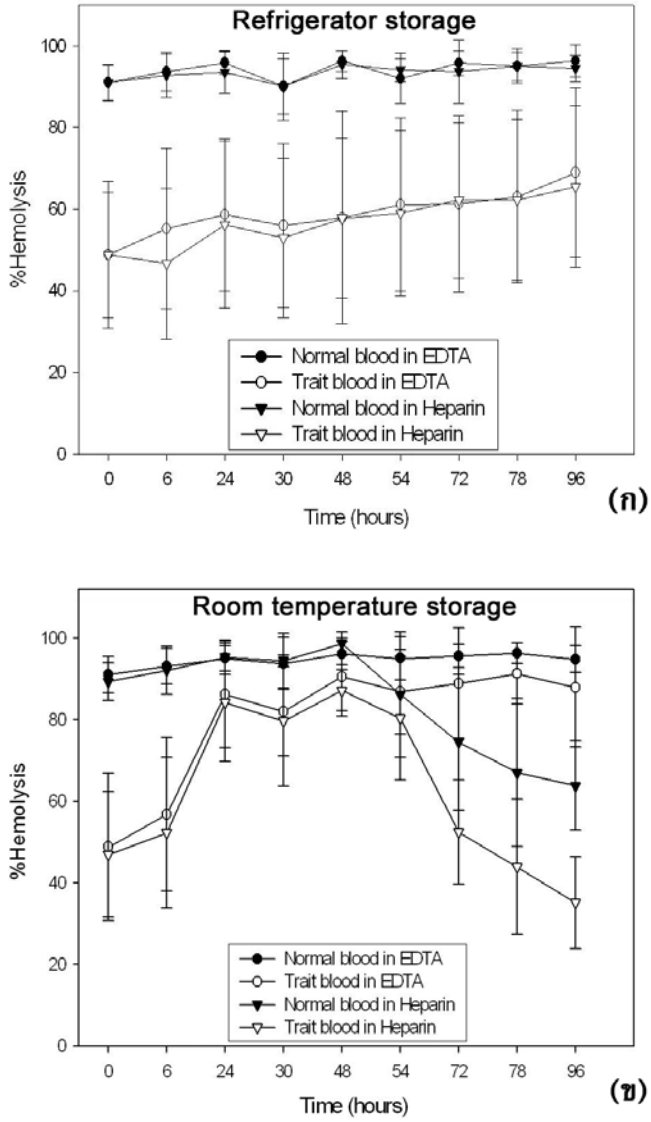
ผลการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดไว้ในตู้เย็นและอุณหภูมิห้อง เมื่อนำตัวอย่างเลือดมาตรวจวิเคราะห์ร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง (%hemolysis) โดยวิธี two minute OFT ที่เวลาต่างๆ สามารถแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงของกลุ่มคนปกติและผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย ดังรูป 2 (ก) และ 2 (ข)



รูป 2 ค่าเฉลี่ยร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เวลาต่างๆ ของกลุ่มคนปกติและผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย โดยวิธี two minute OFT เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิด (ก) เก็บในตู้เย็น (ข) เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. การเก็บตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดในตู้เย็นและที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำตัวอย่างเลือดมาตรวจวิเคราะห์ร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง (%Hemolysis) โดยวิธี five minute OFT ที่เวลาต่างๆ สามารถแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงของกลุ่มคนปกติและผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย ดังรูป 3 (ก) และ 3 (ข)



รูป 3 ค่าเฉลี่ยร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เวลาต่างๆ ของกลุ่มคนปกติและผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย โดยวิธี five minute OFT เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิด (ก) เก็บในตู้เย็น (ข) เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. การเก็บตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดไว้ในตู้เย็น และอุณหภูมิห้อง เมื่อนำตัวอย่างเลือดมาตรวจโดยวิธี overnight OFT ที่เวลาต่างๆ โดยดูการแตกและการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง แล้วนำผลการตรวจที่ได้มาคำนวณเป็นร้อยละของประสิทธิภาพของผลการตรวจเทียบกับผลของการตรวจยืนยัน (%efficiency) แสดงดังตาราง 1 ทั้งในกลุ่มคนปกติและผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย

ตาราง 1 แสดงร้อยละของประสิทธิภาพของผลการตรวจด้วยวิธี overnight OFT ในกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างเลือดที่สภาวะต่างๆ

Factors	%efficiency *			
Times (hours)	EDTA blood เก็บในตู้เย็น	heparin blood เก็บในตู้เย็น	EDTA blood ที่อุณหภูมิห้อง	heparin blood ที่อุณหภูมิห้อง
0	100	100	100	100
6	100	100	100	95
24	95	95	80	75
30	90	95	70	65
48	100	90	65	65
54	100	100	70	60
72	100	100	60	55
78	90	95	55	70
96	90	90	50	45

$$* \%\text{efficiency} = \frac{\text{number of true positive} + \text{number of true negative}}{\text{number of total}} \times 100$$

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ ระยะเวลา และสารกันเลือดแข็ง ชนิด EDTA และ heparin ในการเก็บรักษาตัวอย่างเลือด สำหรับการตรวจโดยวิธี one tube OFT โดยวัดร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงและอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง ในกลุ่มคนปกติและกลุ่มที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย

ในการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA และ heparin ในการเก็บตัวอย่างเลือด แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ โดยวิธี one tube OFT ที่เวลาต่างๆ พบว่าผลที่ได้จากทั้งสามวิธีไม่แตกต่างกัน เนื่องจากสารกันเลือดแข็งทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติที่

เหมือนกันคือไม่ทำให้รูปร่างและขนาดของเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าชนิดของสารกันเลือดแข็งทั้งสองที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดให้ผลต่อการตรวจไม่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี one tube OFT แต่ในงานวิจัยของ Kafka และ Yermiahu (1998) พบว่า EDTA ที่มีผลต่อ osmotic fragility ของเม็ดเลือดแดง โดย EDTA จะทำให้ค่า osmotic fragility ของเม็ดเลือดแดงสูงขึ้นเมื่อเทียบกับ heparin

เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างเลือดไว้ในตู้เย็นและอุณหภูมิห้องแล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ ด้วยวิธี one tube OFT ที่เวลาต่างๆ พบว่าผลที่ได้ในแต่ละวิธีมีความแตกต่างกัน จากรูป 2 (ข) และ 3 (ข) จะเห็นว่าระหว่างชั่วโมงที่ 6 และ 24 กราฟมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงในทิศทางที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าให้ค่าเฉลี่ยที่มีความแต่งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P-value $<$ 0.05) เมื่อศึกษาเพิ่มเติมในชั่วโมงที่ 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่าการเก็บเลือดที่อุณหภูมิห้องซึ่งใช้ EDTA และ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ให้ผลการตรวจในชั่วโมงที่ 18 แตกต่างจากชั่วโมงที่ 0 โดยวิธี two minute OFT และ overnight OFT ส่วนวิธี five minute OFT ให้ผลการตรวจที่แตกต่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในตู้เย็นมีความแตกต่างกันในชั่วโมงที่ 96 เมื่อตรวจด้วยวิธี two minute OFT และ overnight OFT ส่วนวิธี five minute OFT ไม่มีความแตกต่างในแต่ละชั่วโมง แต่จากการคำนวณทางสถิติ พบว่าการเก็บตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิห้องเพื่อตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียด้วยวิธี one tube OFT ทั้งสามวิธี ควรตรวจวิเคราะห์ภายใน 15 ชั่วโมง เนื่องจากมีค่าเฉลี่ยร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง (%hemolysis) ไม่แตกต่างจากชั่วโมงเริ่มต้น โดยเปรียบเทียบจากค่า P-value ของชั่วโมงต่างๆ กับชั่วโมงที่ 0 สำหรับการเก็บเลือดในตู้เย็น ควรตรวจวิเคราะห์ภายใน 54 ชั่วโมง เมื่อใช้วิธี two minute OFT และ overnight OFT ส่วนวิธี five minute OFT ควรตรวจวิเคราะห์ภายใน 30 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Okwusidi (2004) ที่พบว่าการเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่ 48 ชั่วโมง จะทำให้ค่าเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างจากตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้ 0, 12 และ 24 ตามลำดับ เนื่องจากการเก็บเลือดไว้นานจะส่งผลให้ความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงเสียไป จึงทำให้ความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง เมื่ออยู่ในสารละลายเจือจางจะทำให้น้ำเข้าไปภายในเซลล์เม็ดเลือดได้ง่ายขึ้นตามแรงดันออสโมติก ซึ่งเป็นผลให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ง่ายขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Rifkind และคณะ (1983) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ osmotic fragility กับอายุของเม็ดเลือดแดง พบว่าเม็ดเลือดแดงที่มีอายุมากจะมีค่าเฉลี่ยของ osmotic fragility สูงกว่าเม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อยกว่า

สำหรับการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่าง one tube osmotic fragility test ทั้งสามวิธี เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในตู้เย็น โดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA หรือ heparin พบว่าวิธี two minute OFT ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่แตกต่างกับวิธี overnight OFT เนื่องจากทั้งสองวิธี มีหลักการและวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เหมือนกันต่างกันที่การอ่านผล ส่วน five minute OFT จะให้ผลการตรวจวิเคราะห์แตกต่างจากวิธีอื่น

แต่ในการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA หรือ heparin พบว่าทั้งสามวิธีมีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้น นอกจากอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดแล้ว หลักการในการตรวจวิเคราะห์และการอ่านผลยังส่งผลให้เกิดความแตกต่างอีกด้วย เนื่องจาก two minute OFT เป็นการตรวจวัดความขุ่นของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในสารละลายกลีเซอรีน ส่วน overnight OFT อ่านผลจากการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง ซึ่งต่างจากวิธี five minute OFT ที่วัดความเข้มของสีที่เกิดจากแตกของเม็ดเลือดแดง

สรุปได้ว่าการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดเพื่อทำการทดสอบด้วยวิธี one tube OFT สามารถใช้สารกันเลือดแข็งได้ทั้งชนิด EDTA และ heparin โดยเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 15 ชั่วโมง หรือเก็บในตู้เย็นได้ไม่เกิน 54 ชั่วโมง ทั้งวิธี two minute OFT และ overnight OFT ส่วนวิธี five minute OFT สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 15 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ในตู้เย็นได้ไม่เกิน 30 ชั่วโมง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ อาสาสมัครทุกท่านที่บริจาคเลือดเพื่อใช้ในการวิจัยและให้ความร่วมมือในการวิจัยเป็นอย่างดี การวิจัยครั้งนี้คงไม่สามารถสำเร็จลุล่วงด้วยดี ถ้าไม่ได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรซึ่งเอื้อเฟื้อสถานที่ สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดจนบุคลากรของภาควิชาฯ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการวิจัยอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี, มาลิดา พรพัฒน์กุล, ปราณี ฟู่เจริญ, สุพรรณ ฟู่เจริญ และทัศนีย์ เล็บนาค. (2541). ธาลัสซีเมีย: คู่มือการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. เครือข่ายงานธาลัสเซียเมียและมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย กรุงเทพมหานคร, 90 หน้า

วิชัย เหล่าสมบัติ. (2541). ธาลัสซีเมีย (Thalassemia). โอเอสพริ้นติ้งเฮาส์ กรุงเทพฯ, 249 หน้า

สุนารี องค์เจริญใจ. (2540). เทคนิคพื้นฐานทางโลหิตวิทยา (Basic techniques in hematology). คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร, 141 หน้า

อานนท์ บุณยะรัตเวช. (2535). โลหิตวิทยา: เม็ดเลือดแดง. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง กรุงเทพฯ, 340 หน้า

Kafka, M. and Yermiahu, T. (1998). The effect of EDTA as an anticoagulant on the osmotic fragility of erythrocytes. *Clinical and Laboratory Haematology*, *20*(4), 213-216.

Kattamis, C., Efremov, G. and Pootrakul, S. (1981). Effectiveness of one tube osmotic fragility screening in detecting beta-thalassaemia trait. *Journal of Medical Genetics*, 1*8*(4), 266-270.

Okwusidi, J. I. (2004). Long term storage stabilizes human erythrocyte membrane in Nigerian black males. *African Journal of Biomedical Research*, *7*(1), 9-12.

Rifkind, J. M., Araki, K. and Hadley, E. C. (1983). The relationship between the osmotic fragility of human erythrocytes and cell age. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *222*(2), 582-589.