การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด
Blood Cell Count

นันทรัตน์ โฆมานะสิน

เซลล์เม็ดเลือดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเลือด ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด ซึ่งในภาวะปกติเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดทำหน้าที่ที่แตกต่างกัน หากมีความผิดปกติในด้านจำนวนหรือหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดจะทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ ดังนั้นการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดในกระแสเลือดจึงเป็นการทดสอบพื้นฐานทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยาที่สามารถตรวจกรอง สนับสนุนการวินิจฉัย และติดตามการรักษาโรคที่เกี่ยวกับเลือดได้

การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดในปัจจุบันทำได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีนับด้วยมือ (manual method) เป็นการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดโดยการเจือจางเลือดในอัตราส่วนเลือดต่อน้ำยาเจือจางที่เหมาะสม เพื่อให้มีปริมาณที่สามารถนับได้จากการดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์บนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด (hemocytometer หรือ counting chamber) ที่ทราบปริมาตร
2. วิธีนับด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (automated blood cell count method) เป็นวิธีนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เพราะสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ

ในบทนี้จะกล่าวถึงเฉพาะวิธีนับด้วยมือ ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐาน ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง และสามารถทำในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก รวมทั้งยังเป็นวิธีสำรองในกรณีที่เครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติมีปัญหา

การนับเซลล์เม็ดเลือดที่จะกล่าวในบทนี้ประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว อีโอซิโนฟิล (eosinophil) และเกล็ดเลือด โดยการนับเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในประเด็นต่อนี้

1. ค่าการเจือจาง (dilution) ระหว่างเลือดและน้ำยาเจือจาง โดยเซลล์เม็ดเลือดที่มีจำนวนในเลือดสูงสุด จะมีค่าการเจือจางสูงสุด (1:200) เกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาว และอีโอซิโนฟิล มีจำนวนน้อยลงตามลำดับ ค่าการเจือจางก็จะลดน้อยลงตามลำดับเป็น 1:100, 1:20 และ 1:10 ตามลำดับ
2. ชนิดของน้ำยาเจือจาง โดยน้ำยาเจือจางบางชนิดมีคุณมสมบัติเป็น isotonic หรือ hypotonic ขึ้นกับว่าในการนับเซลล์เม็ดเลือดชนิดนั้นต้องมีการทำลายเม็ดเลือดแดงหรือไม่ หากต้องทำลายเม็ดเลือดแดงน้ำยาเจือจางที่ใช้จะมีคุสมบัติเป็น hypotonic

นอกจากนี้ หากการนับเซลล์เม็ดเลือด ต้องมีการย้อมสีของแกรนูล (granule) ในน้ำยาเจือจางก็จะมีสีเพื่อย้อมแกรนูลเป็นส่วนประกอบ

3. กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ของกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการนับเซลล์เม็ดเลือดขึ้นกับขนาดของเซลล์ดม็ดเลือดที่นับ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวและอีโอซิโนฟิลที่มีขนาดใหญ่ จะดูด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10x ในขณะที่เกล็ดเลือดและเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดเล็กกว่า จะดูด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40x
4. จำนวนช่องบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดแล้ว โดยช่องที่ใช้นับจะขึ้นอยู่กับจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดที่พบในเลือด

การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cell count)

เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่

หลักการ

เมื่อเจือจางเลือดด้วยน้ำยานับเม็ดเลือดขาว ซึ่งสามารถสลายเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีนิวเคลียส แต่คงสภาพเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสไว้ได้ ในสัดส่วนที่เหมาะสม จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้บนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดซึ่งทราบปริมาตรแน่นอน จะสามารถคำนวณกลับไปเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดได้

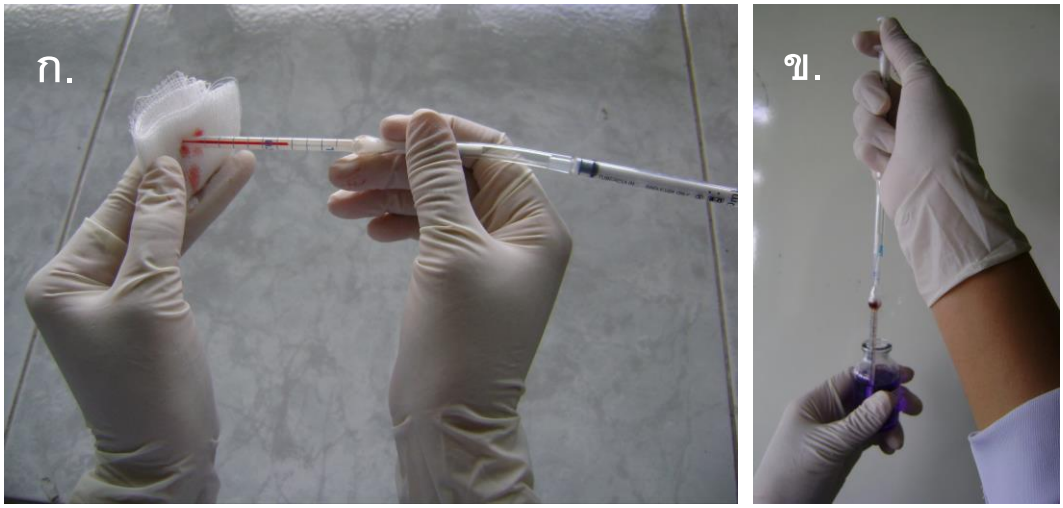
อุปกรณ์และน้ำยา

1. ปิเปตต์นับเม็ดเลือดขาว
2. ลูกยางเบอร์ 6 หรือ อุปกรณ์ดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็ก
3. แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐาน
4. เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด
5. กล้องจุลทรรศน์
6. น้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาว ที่นิยมใช้กันมากคือ Turk's solution ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้
   - glacial acetic acid (CH_3COOH) 3.0 มล.
   - 1% (w/v) aqueous gentian violet 1.0 มล.
   - เติมน้ำกลั่นจนครบ 100.0 มล.

   ส่วนน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ๆ ที่ใช้แทน Turk's solution คือ 1-2% hydrochloric acid, 1-2% glacial acetic acid

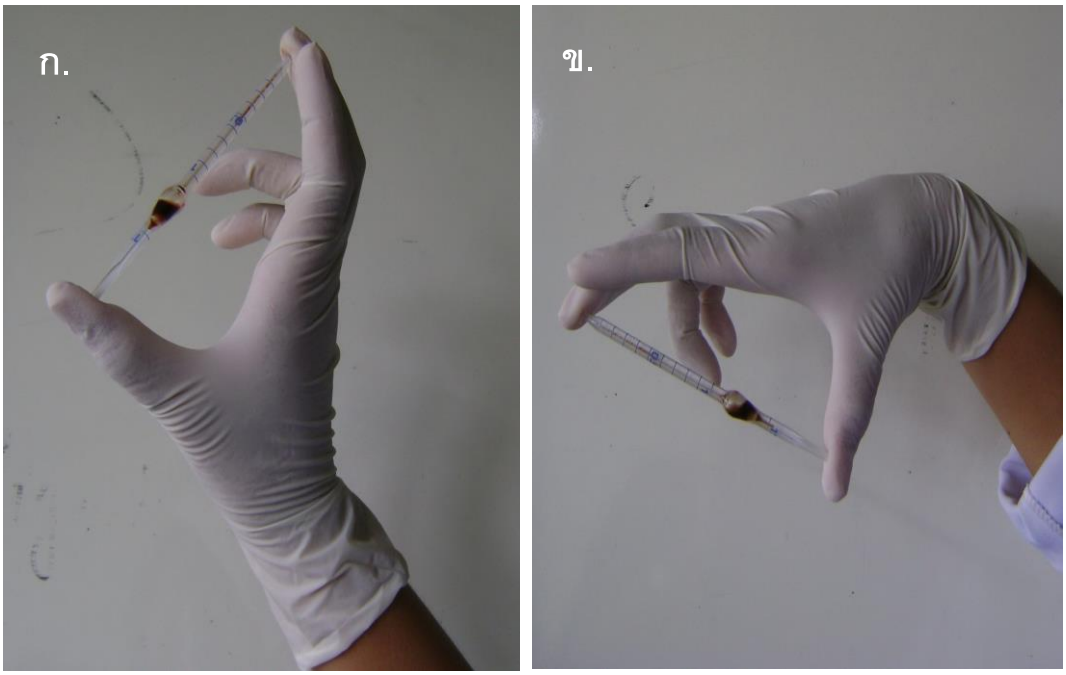
วิธีการ

1. ผสมเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งให้เข้ากัน แล้วดูดเลือดจากขวดหรือดูดเลือดที่เจาะจากปลายนิ้วเข้าใน ปิเปตต์นับเม็ดเลือดขาว ให้ถึงขีด 0.5 พอดี ขณะดูดเลือดให้ปิเปตต์อยู่ในลักษณะเกือบเป็นแนวตั้ง
2. เช็ดปิเปตต์ด้านนอกให้สะอาด ถ้าดูดเลือดเกินขีด 0.5 ขึ้นมาเล็กน้อย (ไม่เกิน 2 มม.) ให้ปรับมาอยู่ที่ขีด 0.5 โดยใช้ผ้าก๊อซหรือกระดาษชำระที่สะอาดแตะที่ปลายปิเปตต์เพื่อซับเลือดส่วนเกินออก (รูปที่ 6.1 ก) แต่ถ้าดูดเลือดเกินขีด 0.5 ขึ้นมามาก ให้รีบเป่าเลือดออกแล้วดูดน้ำสะอาดหรือน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวเข้ามาในกระเปาะ แล้วจึงล้างให้สะอาดภายหลังเพื่อป้องกันการอุดตันของปิเปตต์จากนั้นจึงใช้ปิเปตต์อันใหม่ดูดเลือดอีกครั้ง
3. ดูดน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวถึงขีด 11 โดยยังคงให้ปิเปตต์อยู่ในลักษณะเกือบเป็นแนวตั้ง เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในกระเปาะปิเปตต์ (รูปที่ 6.1ข)



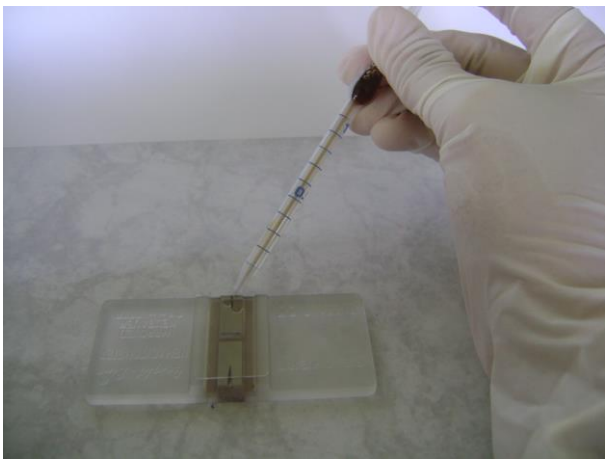
รูปที่ 6.1 ก. การจับปิเปตต์นับเม็ดเลือดขณะปรับปริมาตรเพื่อให้ได้เลือดตามต้องการ
ข. การจับปิเปตต์นับเม็ดเลือดขณะดูดน้ำยาเจือจาง

4. จับปิเปตต์ให้อยู่ในแนวราบ ใช้นิ้วปิดปลายปิเปตต์ไว้ แล้วถอดลูกยางหรืออุปกรณ์ดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็กออก
5. จับปิเปตต์โดยปิดปลายทั้งสองข้างด้วยนิ้วหัวแม่มือและนิ้วกลาง (รูปที่ 6.2 ก) แล้วสะบัดข้อมือไปมาในแนวราบ (รูปที่ 6.2 ข) นาน 3-5 นาที หรือใช้เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด นาน 2-3 นาที เพื่อผสมเลือดและน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวให้เข้ากัน ทำให้เม็ดเลือดขาวมีการกระจายตัวดี ไม่เกาะเป็นกลุ่ม



รูปที่ 6.2 ก. การจับปิเปตต์นับเม็ดเลือดเพื่อเขย่าผสมสารละลายในปิเปตต์
ข. การเขย่าปิเปตต์นับเม็ดเลือดโดยสะบัดข้อมือไปมา

6. หยดสารละลายจากปิเปตต์ 1-2 หยดแรกทิ้งไป เพราะส่วนนี้จะอยู่ที่ก้านปิเปตต์ซึ่งไม่ได้ผสมกับเลือด
7. หยดสารละลายหยดต่อไปลงตรงร่องของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่ปิดกระจกปิดทับมาตรฐานไว้เรียบร้อยแล้วทั้ง 2 ด้าน โดยให้ปิเปตต์ทำมุมกับแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดประมาณ 45 องศา ใช้นิ้วชี้ปิดปลายด้านบนของปิเปตต์ไว้เพื่อควบคุมให้สารละลายออกจากปิเปตต์เข้าสู่แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดพอดี (รูปที่ 6.3) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดขาวหยุดนิ่ง



รูปที่ 6.3 การหยดสารละลายจากปิเปตต์นับเม็ดเลือดใส่แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

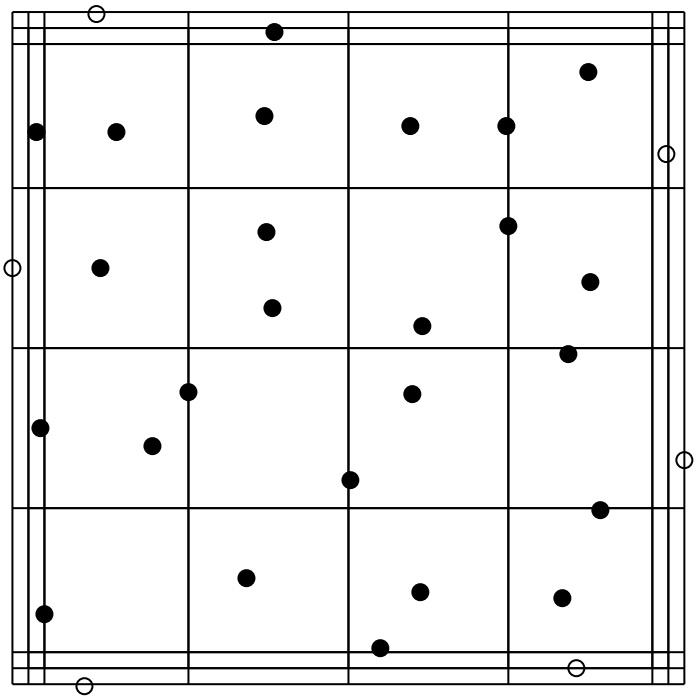
ถ้ามีฟองอากาศหรือสารละลายหยดใหญ่เกินไปจนล้น ให้ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% และผ้าสะอาดและนุ่ม เช็ดแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐาน แล้วจึงหยดสารละลายใหม่ โดยต้องเขย่าสารละลายในปิเปตต์ให้เข้ากันดีก่อนที่จะหยดใหม่ทุกครั้ง

8. นับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำ (10X) ในช่อง W ที่มุมทั้ง 4 ของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด (รูปที่ 1.2 หน้า...) นำจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดมารวมกัน แล้วคำนวณเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวต่อ ลบ.มม. หรือ ล.

เพื่อป้องกันการสับสนหรือนับซ้ำ จึงควรมีกฎเกณฑ์ในการนับของตัวเองไว้ เช่น ในตารางเล็ก ๆ 16 ช่อง จะนับเฉพาะเม็ดเลือดขาวที่อยู่ในช่องและที่ทับเส้นด้านบนและด้านซ้ายของแต่ละช่องเท่านั้นจะไม่นับเม็ดเลือดขาวที่ทับอยู่บนเส้นด้านล่างและด้านขวา

สำหรับเม็ดเลือดที่ทับอยู่บนเส้น 3 เส้นของช่อง W นั้น จะนับเฉพาะเม็ดเลือดที่ทับเส้นกลางเข้ามาเพียง 2 ด้านใน 4 ด้านใดก็ได้ เช่น ที่ทับเส้นกลางด้านบนและเส้นกลางด้านซ้ายเป็นต้น (รูปที่ 6.4)

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ดีนั้น จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในแต่ละช่อง W ไม่ควรต่างกันเกิน 12 เซลล์ หรือมากที่สุดไม่ควรเกิน 15 เซลล์ ถ้าหากเกินให้เริ่มทำการเจือจางใหม่



เซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับ (●) และไม่นับ (○) ใน 16 ช่องเล็กของ 1 ช่อง W

2	2	1	2
1	2	1	2
2	1	2	1
1	1	2	2

จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในแต่ละช่อง

รูปที่ 6.4 วิธีการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวในบริเวณนับเม็ดเลือดขาว (W) 1 ช่อง (รูปนี้นับเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทับเส้นด้านบนและด้านซ้ายของแต่ละช่องเท่านั้นและใช้เส้นกลางเป็นหลักในกรณีที่ช่องนั้นมีด้านที่นับเป็น 3 เส้น)

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ดีนั้น จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในแต่ละช่อง W ไม่ควรต่างกัน

เกิน 12 เซลล์ หรือมากที่สุดไม่ควรเกิน 15 เซลล์ ถ้าหากเกินให้เริ่มทำการเจือจางใหม่

9. เมื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาวเสร็จ ให้รีบทำความสะอาดอุปกรณ์ทันที

การคำนวณ

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาว/ล.} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ x dilution factor x } 10^6}{\text{ปริมาตรที่ใช้นับ (ไมโครลิตร)}}$$

dilution factor คำนวณได้ดังนี้

จากการเจือจางเลือดเพื่อนับเม็ดเลือดขาว ดูดเลือดถึงขีด 0.5 และดูดน้ำยาเจือจางไปถึงขีด 11 แต่เลือดผสมกับน้ำยาจริง ๆ ในบริเวณกระเปาะ10 ส่วน เพราะยังคงมีน้ำยาเจือจางอีก 1 ส่วน ค้างอยู่ในปิเปตต์และไม่ได้ผสมกับเลือด ดังนั้นเลือดจึงถูกเจือจางไป 1:20 และ dilution factor เท่ากับ 20

ปริมาตรที่ใช้นับเม็ดเลือดขาว คำนวณได้จากปริมาตรของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดบริเวณที่นับเม็ดเลือดขาว ดังนี้

ปริมาตรที่ใช้นับเม็ดเลือดขาว

= พื้นที่ x ความลึก x จำนวนช่อง W ที่นับ

= (1x1) x 0.1 x 4

= 0.4 ลบ.มม.หรือ 0.4 ไมโครลิตร

ดังนั้นจำนวนเม็ดเลือดขาว/ล.

$$= \frac{N \times 20 \times 10^6}{0.4}$$

$$= N \times 50 \times 10^6$$

N คือ จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้ง 4 ช่อง W

จากสูตรจะเห็นว่า dilution factor สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามปริมาณของเลือดที่ใช้ในแต่ละครั้ง โดยที่อาจใช้เลือด 0.1,0.2,0.3,.....1.0 ส่วนก็ได้ ตามความเหมาะสม หรือในกรณีที่นับเม็ดเลือดขาวน้อยกว่าหรือมากกว่า 4 ช่อง W ซึ่งกรณีดังกล่าวก็จะต้องคำนวณหาแฟกเตอร์ที่คูณใหม่

หมายเหตุ

1. กรณีที่มีเม็ดเลือดขาวสูงมาก เช่น ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) การเจือจางเลือดเพียง 1:20 อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย กรณีดังกล่าวนี้ควรเจือจางเลือดให้มากกว่าปกติ โดยอาจใช้ปิเปตต์นับเม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถเจือจางเลือดได้ 1:100 หรือ 1:200 ตามความเหมาะสม คือ ถ้าจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่า $30x10^9$/ล. (30,000/ลบ.มม.) ควรเจือจางเลือด 1:100 และถ้าจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่า $100x10^9$/ล. (100,000/ลบ.มม.) ควรเจือจางเลือด 1:200 เป็นต้น
2. กรณีที่มีเม็ดเลือดขาวต่ำ (ต่ำกว่า $3.0x10^9$/ล. หรือ 3,000/ลบ.มม.) เช่น ในผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (leukopenia) การเจือจางเลือด 1:20 ก็อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่ายเช่นกัน ดังนั้นจึงควรเจือจางเลือดให้น้อยกว่าปกติ โดยอาจดูดเลือดไปจนถึงขีด 1.0 ซึ่งจะทำให้เลือดถูกเจือจางไปเพียง 1:10 เท่านั้น
3. การมีเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส (nucleated red cell ; NRC) จะทำให้ถูกนับรวมไปกับเม็ดเลือดขาวด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการนับแก้จำนวนเม็ดเลือดขาวก่อน ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป
4. ความผิดพลาดในการนับเม็ดเลือดขาว อาจเกิดได้เนื่องจากอุปกรณ์ น้ำยา หรือเทคนิคการทำดังต่อไปนี้
   4.1 ความผิดพลาดจากอุปกรณ์
      ก. อุปกรณ์ที่ใช้ไม่ได้มาตรฐาน เช่น ปิเปตต์ แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด และกระจกปิดทับมาตรฐาน
      ข. อุปกรณ์ที่ใช้ไม่สะอาด เช่น มีคราบไขมันติด หรือ เช็ดไม่แห้ง ก่อนนำมาใช้
      ค. อุปกรณ์ชำรุด เช่น ปิเปตต์หรือกระจกปิดทับมาตรฐานที่แตกหัก
   4.2 ความผิดพลาดจากน้ำยา
      ก. เตรียมน้ำยาผิด
      ข. น้ำยามีเลือดผสมอยู่ก่อน มีฝุ่นละออง หรือเชื้อราปนเปื้อน
   4.3 ความผิดพลาดจากเทคนิคการทำ
      ก. การดูดเลือด
         - ไม่ได้ผสมเลือดในขวดให้เข้ากันดีเสียก่อน
         - ดูดเลือดไม่ถึงหรือเกินขีด 0.5 ส่วน
         - มีฟองอากาศขณะดูดเลือด
      ข. การดูดน้ำยา
         - ดูดน้ำยาไม่ถึงหรือเกินขีด 11
         - มีฟองอากาศขณะดูดน้ำยา
         - ดูดน้ำยาช้าเกินไป ทำให้มีเลือดบางส่วนจับกลุ่มกัน
      ค. การผสมเลือดกับน้ำยา
         - เขย่าไม่นานพอที่เลือดจะผสมกับน้ำยา
      ง. การหยดสารละลายจากปิเปตต์ใส่แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด
         - ไม่ได้หยดสารละลาย 1-2 หยดแรกทิ้งไปก่อน
         - ไม่ได้เขย่าให้เข้ากันดีก่อนหยดสารละลาย ในกรณีที่วางปิเปตต์ไว้โดยไม่หยดทันทีหลังเขย่า
         - หยดสารละลายลงบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดมากเกินไปหรือน้อยเกินไป หรือมีฟองอากาศ
      จ. การนับผิดพลาด
         - เม็ดเลือดขาวยังไม่หยุดนิ่งขณะนับ
         - นับซ้ำหรือลืมนับ
      ฉ. การคำนวณผิดพลาด

5. ในตัวอย่างเลือดที่เม็ดเลือดขาวอยู่ในช่วงค่าปกติ การนับเม็ดเลือดขาวโดยวิธีนี้จะมีความคลาดเคลื่อนประมาณร้อยละ 15

ค่าปกติ

เด็กแรกเกิด 18.1x10^9/ล. (18,100 /ลบ.มม.)

เด็กอายุ 4 ปี 9.1x10^9/ล. (9,100 /ลบ.มม.)

ผู้ใหญ่ 4.5-10.0x10^9/ล. (4,500-10,000 /ลบ.มม.)

(ที่มา: สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. คู่มือโลหิตวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1 (ปรับปรุงแก้ไข). กรุงเทพฯ: โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529: 222)

การแปลผล

ค่าปกติของเม็ดเลือดขาวเปลี่ยนแปลงได้ตามอายุ โดยพบว่าเด็กแรกเกิดมีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงได้ถึง 30x10^9/ล. (30,000/ลบ.มม.) และค่อย ๆ ลดลงมาจนกระทั่งถึงวัยหนุ่มสาว จึงจะมีค่าคงที่ตามปกติ

ภาวะที่จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มมากกว่าปกติ (มากกว่า 10x10^9/ล. หรือ 10,000/ลบ.มม.) พบได้ในภาวะติดเชื้อแบคทีเรีย ไส้ติ่งอักเสบ มะเร็งเม็ดเลือดขาว หัด ไอกรน หญิงตั้งครรภ์ และการรักษาโรคบางอย่างที่ใช้ยาพวกสเตียรอยด์ เป็นต้น

ภาวะที่จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงมากกว่าปกติ (ต่ำกว่า 4x10^9/ล. หรือ 4,000/ลบ.มม.) พบได้ในภาวะติดเชื้อไวรัส ไข้ไทฟอยด์ ไวรัสตับอักเสบ ตับแข็ง ภาวะเลือดจางอพลาสติก เบาหวาน ไข้เลือดออก และผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสี เป็นต้น

การนับแก้จำนวนเม็ดเลือดขาว (Corrected white blood cell count)

ในการนับจำนวนเม็ดเลือดขาว ความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้อย่างหนึ่งซึ่งทำให้ได้ค่าเม็ดเลือดขาวสูงกว่าความเป็นจริง คือ การนับเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสรวมเข้าไป เนื่องจากน้ำยาที่ใช้เจือจางเลือดเพื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสได้ และการดูจากกล้องจุลทรรศน์ขณะนับเม็ดเลือดก็ไม่สามารถทราบได้ว่าเป็นเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส

ดังนั้นเมื่อทำการตรวจสเมียร์เลือด (blood smear) หากพบว่ามีเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสมากกว่า 10 เซลล์ขึ้นไปต่อเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ จะต้องทำการนับแก้จำนวนเม็ดเลือดขาว เพื่อให้ได้ค่าที่แท้จริง โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดที่พบในช่อง W ทั้ง 4 ช่อง แล้วคูณด้วย 50x10^6 หากเป็นการนับเม็ดเลือดขาวตามปกติ สมมุติได้เท่ากับ N เซลล์/ล.
2. ขณะทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (differential WBC count) จากสเมียร์เลือดให้นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสไว้ด้วย เมื่อนับเม็ดเลือดขาวครบ 100 เซลล์ ก็จะทราบว่าเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสต่อ 100 เซลล์เม็ดเลือดขาวเท่ากับเท่าไร สมมุติได้เท่ากับ X เซลล์/เม็ดเลือดขาว 100 เซลล์
3. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดขาวที่แท้จริงตามสูตร

จำนวนเม็ดเลือดขาวที่แท้จริง $= \frac{N \times 100}{100 + X}$ เซลล์/ล.

ตัวอย่าง

นับจำนวนเม็ดเลือดขาวได้ $15x10^9$ เซลล์/ล. แต่เมื่อทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวครบ 100 เซลล์ พบว่ามีเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส 50 เซลล์

จากสูตรข้างต้น $N = \frac{15 \times 10^9}{X = 50}$

ดังนั้นจำนวนเม็ดเลือดขาวที่แท้จริง

$= \frac{N \times 100}{100 + X}$ เซลล์/ล.

$= \frac{15 \times 10^9 \times 100}{100 + 50}$ เซลล์/ล.

$= 10 \times 10^9$ เซลล์/ล.

บรรณานุกรม

1. ธรรมศักดิ์ ประสานพานิช. เวชศาสตร์ชันสูตร. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช, 2516 : 38-62.
2. เพ็ญจันทร์ ส. โมไนยพงศ์. การวิเคราะห์ผลการตรวจและอภิปรายวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการระบบเลือด. ใน: เพ็ญจันทร์ ส. โมไนยพงศ์, บรรณาธิการ. การวิเคราะห์ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับพยาบาล. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพยาบาลศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2532; 42-5.
3. สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. คู่มือโลหิตวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1 (ปรับปรุงแก้ไข). กรุงเทพฯ: โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529: 222.
4. สุทธิพรรณ ประสาทแก้ว. การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว. ใน: สุทธิพรรณ ประสาทแก้ว, นันทรัตน์ โฆมานะสิน, บรรณาธิการ. คู่มือปฏิบัติการจุลทรรศน์วินิจฉัย เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 4. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2533; 59-73.
5. Brown BA. Hematology principles and procedures. 6th ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1993 : 89-95.
6. Collins L. Body fluids. In: Rodak BF. Hematology: clinical principles and applications. 2nd ed. Philadelphia:W.B.Saunders company,2002:591-605.
7. Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology. 8th ed. New York : Churchill Livingstone, 1995 : 59-60.

8. Estridge BA, Reynolds AP. Basic clinical laboratory techniques. 5th ed. Clifton Park, NY:Thomson Delmar Learning, 2008 : 203-14.
9. Hall R, Malia RG. Medical laboratory haematology. 2nd ed. Oxford: Botterworths-Heinemann Ltd, 1991: 156.
10. Koepke JA, Koepke JF. Guide to clinical laboratory diagnosis. 3rd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1987 : 189.
11. Simmons A. Hematology, a combined theoretical & technical approach. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997:265-7.
12. Terrell JC. Laboratory evaluation of leukocyte. In: Lotspeich-Steininger CA, Stiene-Martin EA, Koepke JA, eds. Clinical hematology, principle, procedures, correlations. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1998 : 331-45.
13. Turgeon ML. Clinical laboratory science : the basic and routine techniques. 5th ed. St.Louis: Mosby,2007 : 267-75.

6. การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว

White Blood Cell Count

นพมาศ เข็มทองหลาง

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวในปัจจุบันทำได้ 2 วิธี คือ

1. การนับด้วยวิธีนับด้วยมือ (manual method) อาศัยการเจือจางเลือดก่อนด้วยปิเปตต์นับเม็ดเลือดขาว แล้วทำการนับบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์และการคำนวณ
2. การนับด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (automatic method) วิธีนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เพราะสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ

ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะวิธีนับด้วยมือ เพราะเป็นวิธีพื้นฐานที่ควรทราบและทำได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวในสารน้ำจากร่างกาย (body fluid) ส่วนใหญ่ยังคงใช้ในการนับด้วยวิธีนี้อยู่

หลักการ

เมื่อเจือจางเลือดด้วยน้ำยานับเม็ดเลือดขาว ซึ่งสามารถสลายเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีนิวเคลียส แต่คงสภาพเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสไว้ได้ ในสัดส่วนที่เหมาะสม จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้บนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดซึ่งทราบปริมาตรแน่นอน จะสามารถคำนวณกลับไปเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดได้

อุปกรณ์และน้ำยา

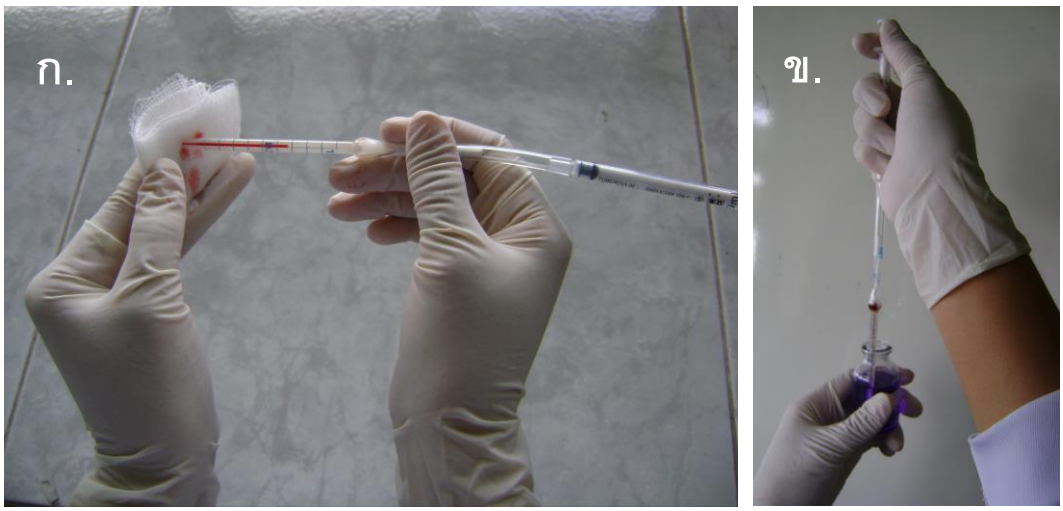
1. ปิเปตต์นับเม็ดเลือดขาว
2. ลูกยางเบอร์ 6 หรือ อุปกรณ์ดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็ก
3. แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐาน
4. เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด
5. กล้องจุลทรรศน์
6. น้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาว ที่นิยมใช้กันมากคือ Turk's solution ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

- glacial acetic acid (CH_3COOH)	3.0	มล.
- 1% (w/v) aqueous gentian violet	1.0	มล.
- เติมน้ำกลั่นจนครบ	100.0	มล.

ส่วนน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ๆ ที่ใช้แทน Turk's solution คือ 1-2% hydrochloric acid, 1-2% glacial acetic acid

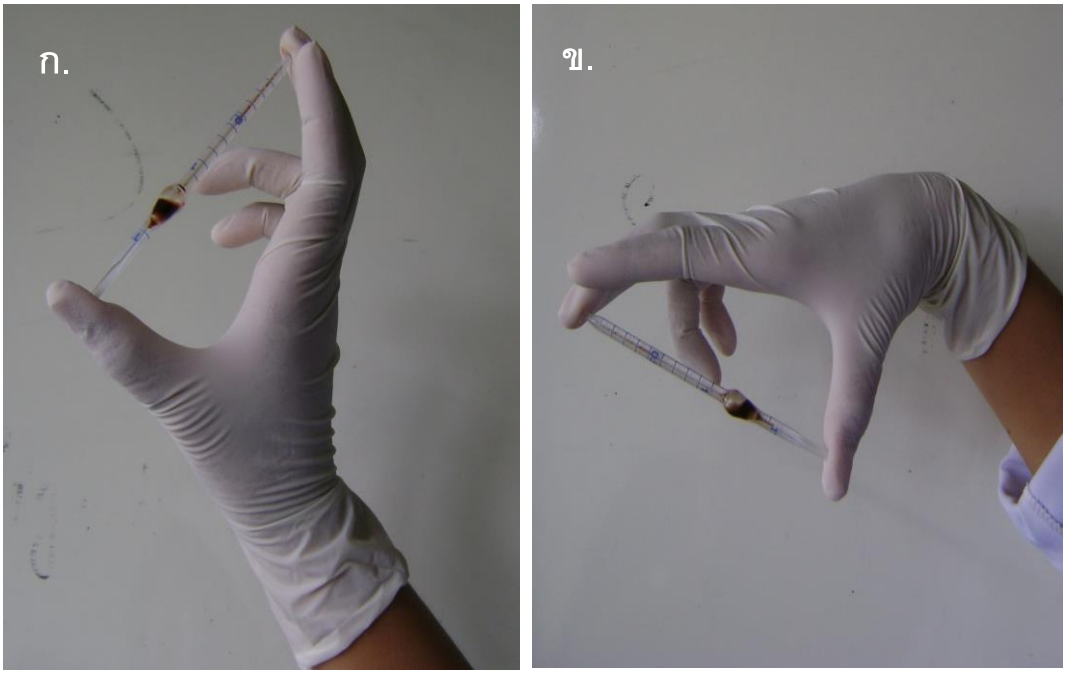
วิธีการ

1. ผสมเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งให้เข้ากัน แล้วดูดเลือดจากขวดหรือดูดเลือดที่เจาะจากปลายนิ้วเข้าในปิเปตต์นับเม็ดเลือดขาว ให้ถึงขีด 0.5 พอดี ขณะดูดเลือดให้ปิเปตต์อยู่ในลักษณะเกือบเป็นแนวตั้ง
2. เช็ดปิเปตต์ด้านนอกให้สะอาด ถ้าดูดเลือดเกินขีด 0.5 ขึ้นมาเล็กน้อย (ไม่เกิน 2 มม.) ให้ปรับมาอยู่ที่ขีด 0.5 โดยใช้ผ้าก๊อซหรือกระดาษชำระที่สะอาดแตะที่ปลายปิเปตต์เพื่อซับเลือดส่วนเกินออก (รูปที่ 6.1 ก) แต่ถ้าดูดเลือดเกินขีด 0.5 ขึ้นมามาก ให้รีบเป่าเลือดออกแล้วดูดน้ำสะอาดหรือน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวเข้ามาในกระเปาะ แล้วจึงล้างให้สะอาดภายหลังเพื่อป้องกันการอุดตันของปิเปตต์ จากนั้นจึงใช้ปิเปตต์อันใหม่ดูดเลือดอีกครั้ง
3. ดูดน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวถึงขีด 11 โดยยังคงให้ปิเปตต์อยู่ในลักษณะเกือบเป็นแนวตั้ง เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในกระเปาะปิเปตต์ (รูปที่ 6.1ข)



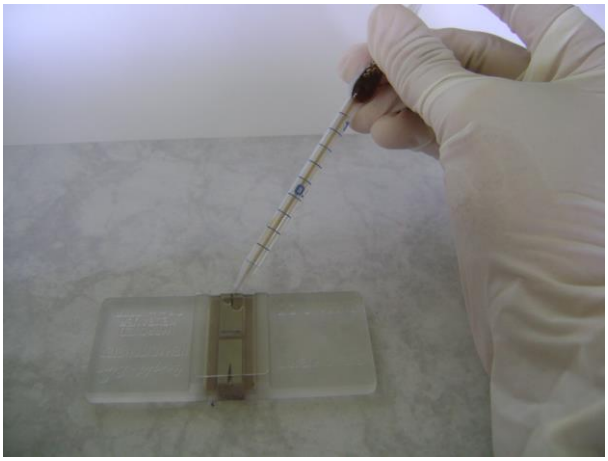
รูปที่ 6.1 ก. การจับปิเปตต์นับเม็ดเลือดขณะปรับปริมาตรเพื่อให้ได้เลือดตามต้องการ
ข. การจับปิเปตต์นับเม็ดเลือดขณะดูดน้ำยาเจือจาง

4. จับปิเปตต์ให้อยู่ในแนวราบ ใช้นิ้วปิดปลายปิเปตต์ไว้ แล้วถอดลูกยางหรืออุปกรณ์ดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็กออก
5. จับปิเปตต์โดยปิดปลายทั้งสองข้างด้วยนิ้วหัวแม่มือและนิ้วกลาง (รูปที่ 6.2 ก) แล้วสะบัดข้อมือไปมาในแนวราบ (รูปที่ 6.2 ข) นาน 3-5 นาที หรือใช้เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด นาน 2-3 นาที เพื่อผสมเลือดและน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวให้เข้ากัน ทำให้เม็ดเลือดขาวมีการกระจายตัวดี ไม่เกาะเป็นกลุ่ม



รูปที่ 6.2 ก. การจับปิเปตต์นับเม็ดเลือดเพื่อเขย่าผสมสารละลายในปิเปตต์
ข. การเขย่าปิเปตต์นับเม็ดเลือดโดยสะบัดข้อมือไปมา

6. หยดสารละลายจากปิเปตต์ 1-2 หยดแรกทิ้งไป เพราะส่วนนี้จะอยู่ที่ก้านปิเปตต์ซึ่งไม่ได้ผสมกับเลือด
7. หยดสารละลายหยดต่อไปลงตรงร่องของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่ปิดกระจกปิดทับมาตรฐานไว้เรียบร้อยแล้วทั้ง 2 ด้าน โดยให้ปิเปตต์ทำมุมกับแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดประมาณ 45 องศา ใช้นิ้วชี้ปิดปลายด้านบนของปิเปตต์ไว้เพื่อควบคุมให้สารละลายออกจากปิเปตต์เข้าสู่แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดพอดี (รูปที่ 6.3) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดขาวหยุดนิ่ง



รูปที่ 6.3 การหยดสารละลายจากปิเปตต์นับเม็ดเลือดใส่แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

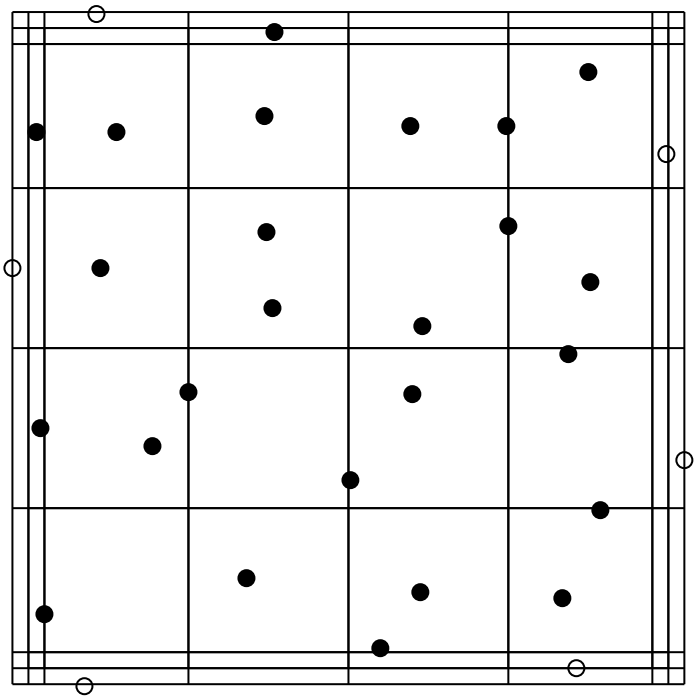
ถ้ามีฟองอากาศหรือสารละลายหยดใหญ่เกินไปจนล้น ให้ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% และผ้าสะอาดและนุ่ม เช็ดแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐาน แล้วจึงหยดสารละลายใหม่ โดยต้องเขย่าสารละลายในปิเปตต์ให้เข้ากันดีก่อนที่จะหยดใหม่ทุกครั้ง

8. นับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำ (10X) ในช่อง W ที่มุมทั้ง 4 ของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด (รูปที่ 1.2 หน้า...) นำจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดมารวมกัน แล้วคำนวณเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวต่อ ลบ.มม. หรือ ล.

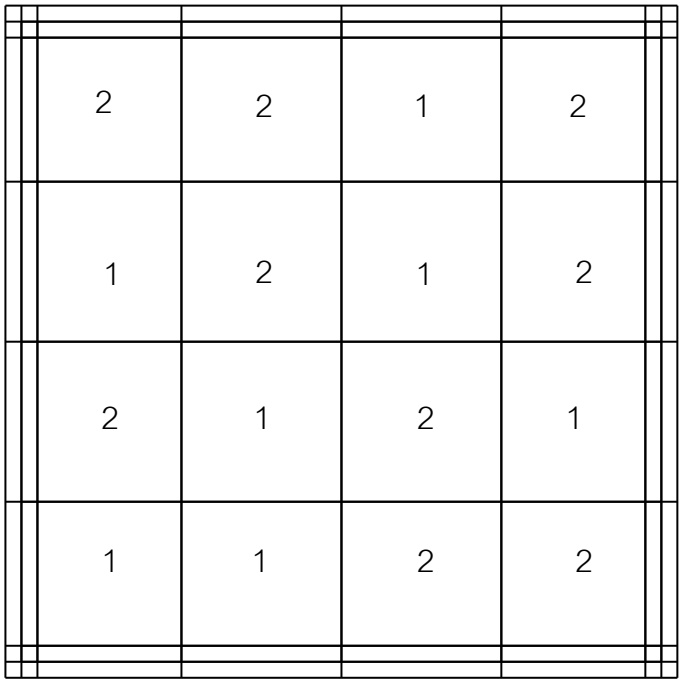
เพื่อป้องกันการสับสนหรือนับซ้ำ จึงควรมีกฎเกณฑ์ในการนับของตัวเองไว้ เช่น ในตารางเล็ก ๆ 16 ช่อง จะนับเฉพาะเม็ดเลือดขาวที่อยู่ในช่องและที่ทับเส้นด้านบนและด้านซ้ายของแต่ละช่องเท่านั้น จะไม่นับเม็ดเลือดขาวที่ทับอยู่บนเส้นด้านล่างและด้านขวา

สำหรับเม็ดเลือดที่ทับอยู่บนเส้น 3 เส้นของช่อง W นั้น จะนับเฉพาะเม็ดเลือดที่ทับเส้นกลางเข้ามาเพียง 2 ด้านใน 4 ด้านใดก็ได้ เช่น ที่ทับเส้นกลางด้านบนและเส้นกลางด้านซ้ายเป็นต้น (รูปที่ 6.4)

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ดีนั้น จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในแต่ละช่อง W ไม่ควรต่างกันเกิน 12 เซลล์ หรือมากที่สุดไม่ควรเกิน 15 เซลล์ ถ้าหากเกินให้เริ่มทำการเจือจางใหม่



เซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับ (●) และไม่นับ (○) ใน 16 ช่องเล็กของ 1 ช่อง W



จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในแต่ละช่อง

รูปที่ 6.4 วิธีการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวในบริเวณนับเม็ดเลือดขาว (W) 1 ช่อง (รูปนี้นับเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทับเส้นด้านบนและด้านซ้ายของแต่ละช่องเท่านั้นและใช้เส้นกลางเป็นหลักในกรณีที่ช่องนั้นมีด้านที่นับเป็น 3 เส้น)

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ดีนั้น จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในแต่ละช่อง W ไม่ควรต่างกันเกิน 12 เซลล์ หรือมากที่สุดไม่ควรเกิน 15 เซลล์ ถ้าหากเกินให้เริ่มทำการเจือจางใหม่

9. เมื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาวเสร็จ ให้รีบทำความสะอาดอุปกรณ์ทันที

การคำนวณ

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาว/ล.} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ x dilution factor x } 10^6}{\text{ปริมาตรที่ใช้นับ (ไมโครลิตร)}}$$

dilution factor คำนวณได้ดังนี้

จากการเจือจางเลือดเพื่อนับเม็ดเลือดขาว ดูดเลือดถึงขีด 0.5 และดูดน้ำยาเจือจางไปถึงขีด 11 แต่เลือดผสมกับน้ำยาจริง ๆ ในบริเวณกระเปาะ10 ส่วน เพราะยังคงมีน้ำยาเจือจางอีก 1 ส่วน ค้างอยู่ในปิเปตต์และไม่ได้ผสมกับเลือด ดังนั้นเลือดจึงถูกเจือจางไป 1:20 และ dilution factor เท่ากับ 20

ปริมาตรที่ใช้นับเม็ดเลือดขาว คำนวณได้จากปริมาตรของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดบริเวณที่นับเม็ดเลือดขาว ดังนี้

ปริมาตรที่ใช้นับเม็ดเลือดขาว

= พื้นที่ x ความลึก x จำนวนช่อง W ที่นับ

= (1x1) x 0.1 x 4

= 0.4 ลบ.มม.หรือ 0.4 ไมโครลิตร

ดังนั้นจำนวนเม็ดเลือดขาว/ล.

$$= \frac{N \times 20 \times 10^6}{0.4}$$

$$= N \times 50 \times 10^6$$

N คือ จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้ง 4 ช่อง W

จากสูตรจะเห็นว่า dilution factor สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามปริมาณของเลือดที่ใช้ในแต่ละครั้ง โดยที่อาจใช้เลือด 0.1,0.2,0.3,.....1.0 ส่วนก็ได้ ตามความเหมาะสม หรือในกรณีที่นับเม็ดเลือดขาวน้อยกว่าหรือมากกว่า 4 ช่อง W ซึ่งกรณีดังกล่าวก็จะต้องคำนวณหาแฟกเตอร์ที่คูณใหม่

หมายเหตุ

1. กรณีที่มีเม็ดเลือดขาวสูงมาก เช่น ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) การเจือจางเลือดเพียง 1:20 อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย กรณีดังกล่าวนี้ควรเจือจางเลือดให้มากกว่าปกติ โดยอาจใช้ปิเปตต์นับเม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถเจือจางเลือดได้ 1:100 หรือ 1:200 ตามความเหมาะสม คือ ถ้าจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่า $30x10^9$/ล. (30,000/ลบ.มม.) ควรเจือจางเลือด 1:100 และถ้าจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่า $100x10^9$/ล. (100,000/ลบ.มม.) ควรเจือจางเลือด 1:200 เป็นต้น
2. กรณีที่มีเม็ดเลือดขาวต่ำ (ต่ำกว่า $3.0x10^9$/ล. หรือ 3,000/ลบ.มม.) เช่น ในผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (leukopenia) การเจือจางเลือด 1:20 ก็อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่ายเช่นกัน ดังนั้นจึงควรเจือจางเลือดให้น้อยกว่าปกติ โดยอาจดูดเลือดไปจนถึงขีด 1.0 ซึ่งจะทำให้เลือดถูกเจือจางไปเพียง 1:10 เท่านั้น
3. การมีเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส (nucleated red cell ; NRC) จะทำให้ถูกนับรวมไปกับเม็ดเลือดขาวด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการนับแก้จำนวนเม็ดเลือดขาวก่อน ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป
4. ความผิดพลาดในการนับเม็ดเลือดขาว อาจเกิดได้เนื่องจากอุปกรณ์ น้ำยา หรือเทคนิคการทำดังต่อไปนี้

    4.1 ความผิดพลาดจากอุปกรณ์

    ก. อุปกรณ์ที่ใช้ไม่ได้มาตรฐาน เช่น ปิเปตต์ แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด และกระจกปิดทับมาตรฐาน

    ข. อุปกรณ์ที่ใช้ไม่สะอาด เช่น มีคราบไขมันติด หรือ เช็ดไม่แห้ง ก่อนนำมาใช้

    ค. อุปกรณ์ชำรุด เช่น ปิเปตต์หรือกระจกปิดทับมาตรฐานที่แตกหัก

    4.2 ความผิดพลาดจากน้ำยา

    ก. เตรียมน้ำยาผิด

    ข. น้ำยามีเลือดผสมอยู่ก่อน มีฝุ่นละออง หรือเชื้อราปนเปื้อน

    4.3 ความผิดพลาดจากเทคนิคการทำ

    ก. การดูดเลือด

    - ไม่ได้ผสมเลือดในขวดให้เข้ากันดีเสียก่อน
    - ดูดเลือดไม่ถึงหรือเกินขีด 0.5 ส่วน
    - มีฟองอากาศขณะดูดเลือด

    ข. การดูดน้ำยา

    - ดูดน้ำยาไม่ถึงหรือเกินขีด 11
    - มีฟองอากาศขณะดูดน้ำยา
    - ดูดน้ำยาช้าเกินไป ทำให้มีเลือดบางส่วนจับกลุ่มกัน

    ค. การผสมเลือดกับน้ำยา

    - เขย่าไม่นานพอที่เลือดจะผสมกับน้ำยา

ง. การหยดสารละลายจากปิเปตต์ใส่แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

- ไม่ได้หยดสารละลาย 1-2 หยดแรกทิ้งไปก่อน
- ไม่ได้เขย่าให้เข้ากันดีก่อนหยดสารละลาย ในกรณีที่วางปิเปตต์ไว้โดยไม่หยดทันทีหลังเขย่า
- หยดสารละลายลงบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดมากเกินไปหรือน้อยเกินไป หรือมีฟองอากาศ

จ. การนับผิดพลาด

- เม็ดเลือดขาวยังไม่หยุดนิ่งขณะนับ
- นับซ้ำหรือลืมนับ

ฉ. การคำนวณผิดพลาด

5. ในตัวอย่างเลือดที่เม็ดเลือดขาวอยู่ในช่วงค่าปกติ การนับเม็ดเลือดขาวโดยวิธีนี้จะมีความคลาดเคลื่อนประมาณร้อยละ 15

ค่าปกติ

เด็กแรกเกิด	18.1×10^9/ล.	(18,100 /ลบ.มม.)
เด็กอายุ 4 ปี	9.1×10^9/ล.	(9,100 /ลบ.มม.)
ผู้ใหญ่	$4.5\text{-}10.0 \times 10^9$/ล.	(4,500-10,000 /ลบ.มม.)

(ที่มา: สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. คู่มือโลหิตวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1 (ปรับปรุงแก้ไข). กรุงเทพฯ: โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529: 222)

การแปลผล

ค่าปกติของเม็ดเลือดขาวเปลี่ยนแปลงได้ตามอายุ โดยพบว่าเด็กแรกเกิดมีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงได้ถึง 30×10^9/ล. (30,000/ลบ.มม.) และค่อย ๆ ลดลงมาจนกระทั่งถึงวัยหนุ่มสาว จึงจะมีค่าคงที่ตามปกติ

ภาวะที่จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มมากกว่าปกติ (มากกว่า 10×10^9/ล. หรือ 10,000/ลบ.มม.) พบได้ในภาวะติดเชื้อแบคทีเรีย ไส้ติ่งอักเสบ มะเร็งเม็ดเลือดขาว หัด ไอกรน หญิงตั้งครรภ์ และการรักษาโรคบางอย่างที่ใช้ยาพวกสเตียรอยด์ เป็นต้น

ภาวะที่จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงมากกว่าปกติ (ต่ำกว่า 4×10^9/ล. หรือ 4,000/ลบ.มม.) พบได้ในภาวะติดเชื้อไวรัส ไข้ไทฟอยด์ ไวรัสตับอักเสบ ตับแข็ง ภาวะเลือดจางอพลาสติก เบาหวาน ไข้เลือดออก และผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสี เป็นต้น

การนับแก้จำนวนเม็ดเลือดขาว (Corrected white blood cell count)

ในการนับจำนวนเม็ดเลือดขาว ความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้อย่างหนึ่งซึ่งทำให้ได้ค่าเม็ดเลือดขาวสูงกว่าความเป็นจริง คือ การนับเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสรวมเข้าไป เนื่องจากน้ำยาที่ใช้เจือจางเลือดเพื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสได้ และการดูจากกล้องจุลทรรศน์ขณะนับเม็ดเลือดก็ไม่สามารถทราบได้ว่าเป็นเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส

ดังนั้นเมื่อทำการตรวจสเมียร์เลือด (blood smear) หากพบว่ามีเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสมากกว่า 10 เซลล์ขึ้นไปต่อเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ จะต้องทำการนับแก้จำนวนเม็ดเลือดขาว เพื่อให้ได้ค่าที่แท้จริง โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดที่พบในช่อง W ทั้ง 4 ช่อง แล้วคูณด้วย 50×10^6 หากเป็นการนับเม็ดเลือดขาวตามปกติ สมมุติได้เท่ากับ N เซลล์/ล.
2. ขณะทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (differential WBC count) จากสเมียร์เลือดให้นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสไว้ด้วย เมื่อนับเม็ดเลือดขาวครบ 100 เซลล์ ก็จะทราบว่าเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสต่อ 100 เซลล์เม็ดเลือดขาวเท่ากับเท่าไร สมมุติได้เท่ากับ X เซลล์/เม็ดเลือดขาว 100 เซลล์
3. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดขาวที่แท้จริงตามสูตร

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่แท้จริง} = \frac{N \times 100}{100 + X} \quad \text{เซลล์/ล.}$$

ตัวอย่าง

นับจำนวนเม็ดเลือดขาวได้ 15×10^9 เซลล์/ล. แต่เมื่อทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวครบ 100 เซลล์ พบว่ามีเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส 50 เซลล์

จากสูตรข้างต้น $N = \frac{15 \times 10^9}{X = 50}$

ดังนั้นจำนวนเม็ดเลือดขาวที่แท้จริง

$$= \frac{N \times 100}{100 + X} \quad \text{เซลล์/ล.}$$

$$= \frac{15 \times 10^9 \times 100}{100 + 50} \quad \text{เซลล์/ล.}$$

$$= 10 \times 10^9 \quad \text{เซลล์/ล.}$$

บรรณานุกรม

1. ธรรมศักดิ์ ประสานพานิช. เวชศาสตร์ชันสูตร. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช, 2516 : 38-62.
2. เพ็ญจันทร์ ส. โมไนยพงศ์. การวิเคราะห์ผลการตรวจและอภิปรายวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการระบบเลือด. ใน: เพ็ญจันทร์ ส. โมไนยพงศ์, บรรณาธิการ. การวิเคราะห์ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับพยาบาล. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพยาบาลศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2532; 42-5.
3. สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. คู่มือโลหิตวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1 (ปรับปรุงแก้ไข). กรุงเทพฯ: โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, 2529: 222.
4. สุทธิพรรณ ประสาทแก้ว. การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว. ใน: สุทธิพรรณ ประสาทแก้ว, นันทรัตน์ โฆมานะสิน, บรรณาธิการ. คู่มือปฏิบัติการจุลทรรศน์วินิจฉัย เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 4. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2533; 59-73.
5. Brown BA. Hematology principles and procedures. 6th ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1993 : 89-95.
6. Collins L. Body fluids. In: Rodak BF. Hematology: clinical principles and applications. 2nd ed. Philadelphia:W.B.Saunders company,2002:591-605.
7. Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology. 8th ed. New York : Churchill Livingstone, 1995 : 59-60.
8. Estridge BA, Reynolds AP. Basic clinical laboratory techniques. 5th ed. Clifton Park, NY:Thomson Delmar Learning, 2008 : 203-14.
9. Hall R, Malia RG. Medical laboratory haematology. 2nd ed. Oxford: Botterworths-Heinemann Ltd, 1991: 156.
10. Koepke JA, Koepke JF. Guide to clinical laboratory diagnosis. 3rd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1987 : 189.
11. Simmons A. Hematology, a combined theoretical & technical approach. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997:265-7.

12. Terrell JC. Laboratory evaluation of leukocyte. In: Lotspeich-Steininger CA, Stiene-Martin EA, Koepke JA, eds. Clinical hematology, principle, procedures, correlations. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1998 : 331-45.
13. Turgeon ML. Clinical laboratory science : the basic and routine techniques. 5th ed. St.Louis: Mosby,2007 : 267-75.

7. การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง

Red blood cell count

อำพร ไตรภัทร

การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดครบ (whole blood) เป็นการตรวจวัดชนิดหนึ่งที่เป็นงานประจำวันของห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยาในโรงพยาบาลทั่วไป ซึ่งในปัจจุบันนิยมนับด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (automated analyzer) เพราะเม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดมีจำนวนมาก การนับด้วยมือ (manual count) อาจให้ผลผิดพลาดได้สูง อย่างไรก็ตาม หากสิ่งส่งตรวจที่นำมานับเซลล์ มีจำนวนเซลล์ไม่มากนัก เช่น สิ่งส่งตรวจที่เป็นสารน้ำร่างกาย (body fluid) ประเภทต่างๆ การนับด้วยมือก็ยังคงมีความจำเป็นอยู่ และหากผู้นับมีความชำนาญ ค่าที่นับด้วยมือย่อมมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยภาวะเลือดข้น (polycythemia) และภาวะเลือดจาง (anemia)

การนับเม็ดเลือดแดงด้วยมือ

หลักการ

เลือกค่าการเจือจางที่เหมาะสมกับจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจที่นำมานับเม็ดเลือดแดง และนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในขอบเขตที่ทราบปริมาตรที่แน่นอน เช่น 0.04 ลบ.มม.

หน่วยในการรายงานผล

อาจรายงานได้ทั้ง ต่อลบ.มม. (ไมโครลิตร) และต่อลิตร การเปลี่ยนหน่วยสามารถทำได้โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างหน่วยทั้งสอง ดังนี้

1 ลบ.มม. = **1 ไมโครลิตร** = 1×10^{-6} **ลิตร**

ดังนั้น 1×10^{6} **ลบ.มม.** = **1 ลิตร**

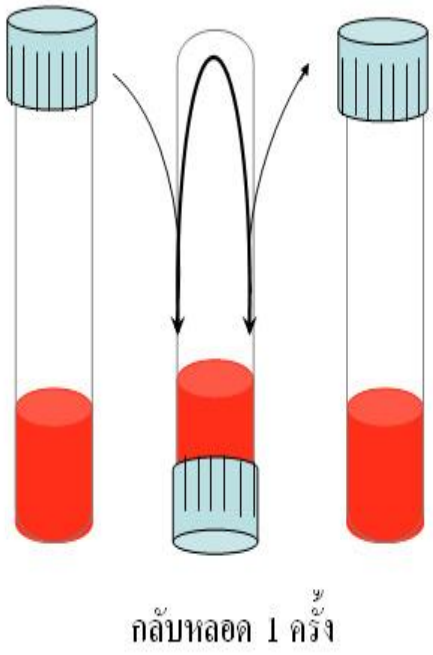
วิธีการ

การนับเม็ดเลือดแดงมี 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเจือจางเลือด ขั้นตอนการนับเม็ดเลือด และขั้นตอนการคำนวณ

1. **ขั้นตอนการเจือจางเลือด** เนื่องจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดครบจะมีเม็ดเลือดแดงอยู่เป็นจำนวนมาก (ในระดับ 10^{6} เซลล์/ไมโครลิตร) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องเลือกค่าการเจือจางที่เหมาะสม โดยอาจใช้อุปกรณ์ที่ทำขึ้นเป็นพิเศษที่เรียกว่า ปิเปตต์เม็ดเลือดแดง (red cell pipette) (รูปที่ 7.1) ในการเจือจางเลือดเพื่อให้ได้ค่าการเจือจางในระดับ 1:100, 1:200 ปิเปตต์เม็ดเลือดแดงจะมีขีดบอกปริมาตรตรงบริเวณส่วนปลายปิเปตต์ ตั้งแต่ 0.1, 0.2 จนถึง 1 ตรงบริเวณใต้กระเปาะ เหนือกระเปาะขึ้นมา จะมีขีดบอกปริมาตร 101 ดังนั้น หากดูดเลือดถึงขีด 0.5 แล้วดูดน้ำยาเจือจางตาม

ขึ้นมาจนถึงขีด 101 ปริมาตรของส่วนผสมในกระเปาะจะเป็น 100 เมื่อเขย่าปิเปตต์ ชิ้นพลาสติกเล็กๆ ที่อยู่ภายในกระเปาะจะขยับไปมา ช่วยผสมให้เลือดกับน้ำยาเจือจางเลือดเข้ากันดี ดังนั้น หากหยดสารละลายในส่วนล่างของกระเปาะที่ไม่ได้ถูกผสมให้เข้ากับเลือดทิ้งไป นำเฉพาะส่วนผสมในกระเปาะมานับ เลือดจะถูกเจือจางไป เท่ากับ 100/0.5 = 200 เท่า

รูปที่ 7.1 ปิเปตต์นับเม็ดเลือดแดง



รูปที่ 7.2 วิธีการผสมเลือดให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดใส่เลือดขึ้นลง

หากไม่มีปิเปตต์เม็ดเลือดแดง อาจใช้อุปกรณ์อื่นที่ให้ความถูกต้องในการเจือจางแทนได้ เช่น ปิเปตต์อัตโนมัติชนิดปรับปริมาตรได้ (adjustible autopipette) โดยใช้ค่าการเจือจางเป็น 1:200 เช่น ใช้เลือด 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยาเจือจาง 1,990 ไมโครลิตร

น้ำยาเจือจางสำหรับนับเม็ดเลือดแดง

น้ำยาเจือจางสำหรับนับเม็ดเลือดแดงมีหลายชนิด เช่น

- Normal saline solution (0.9% NaCl)
- Gower's solution (มีส่วนผสมของ sodium sulfate และ glacial acetic acid)
- Hayem's solution (มีส่วนผสมของ sodium sulfate, sodium chloride และ mercuric chloride)
- Dacie's solution (มีส่วนผสมของ sodium sulfate และ formalin)

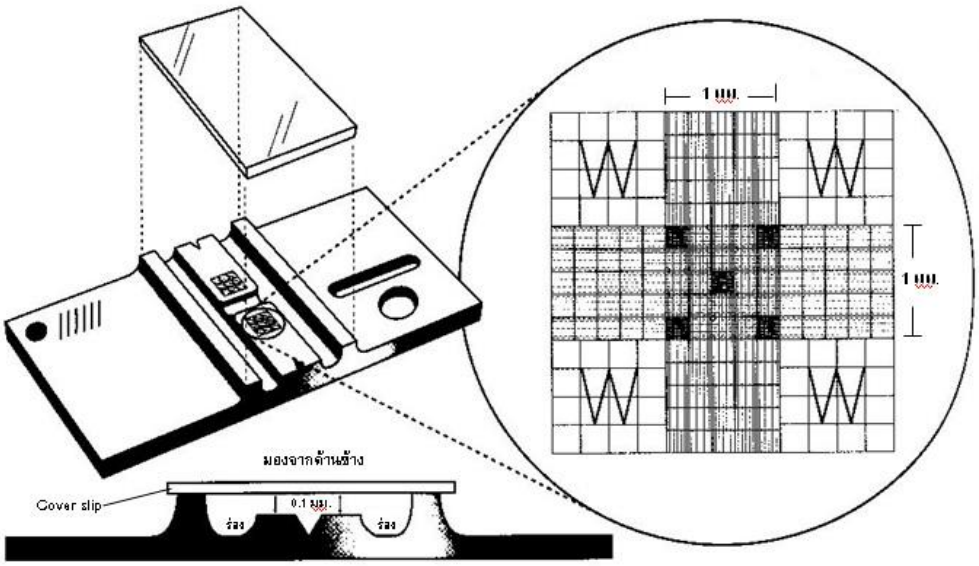
คุณสมบัติที่คล้ายกันประการหนึ่งของน้ำยาเหล่านี้ คือ จะต้องเป็น isotonic solution อย่างไรก็ตาม น้ำยานับเม็ดเลือดแดงที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ Normal saline solution (ประกอบด้วย NaCl 0.9 ก. น้ำกลั่นจนครบ 100 มล.) และ Gower's solution (ประกอบด้วย

Na_2SO_4 12.5 ก., CH_3COOH 33.3 มล., น้ำกลั่นจนครบ 200 มล.) ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบของน้ำยาสามารถหาได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีความปลอดภัยกับผู้ใช้ ส่วนน้ำยาอื่น ๆ บางชนิดมีส่วนประกอบที่อาจเป็นอันตรายกับผู้ใช้หากสัมผัสโดยตรง เช่น mercuric chloride และ formalin

ข้อควรระวัง ในขั้นตอนนี้ คือ

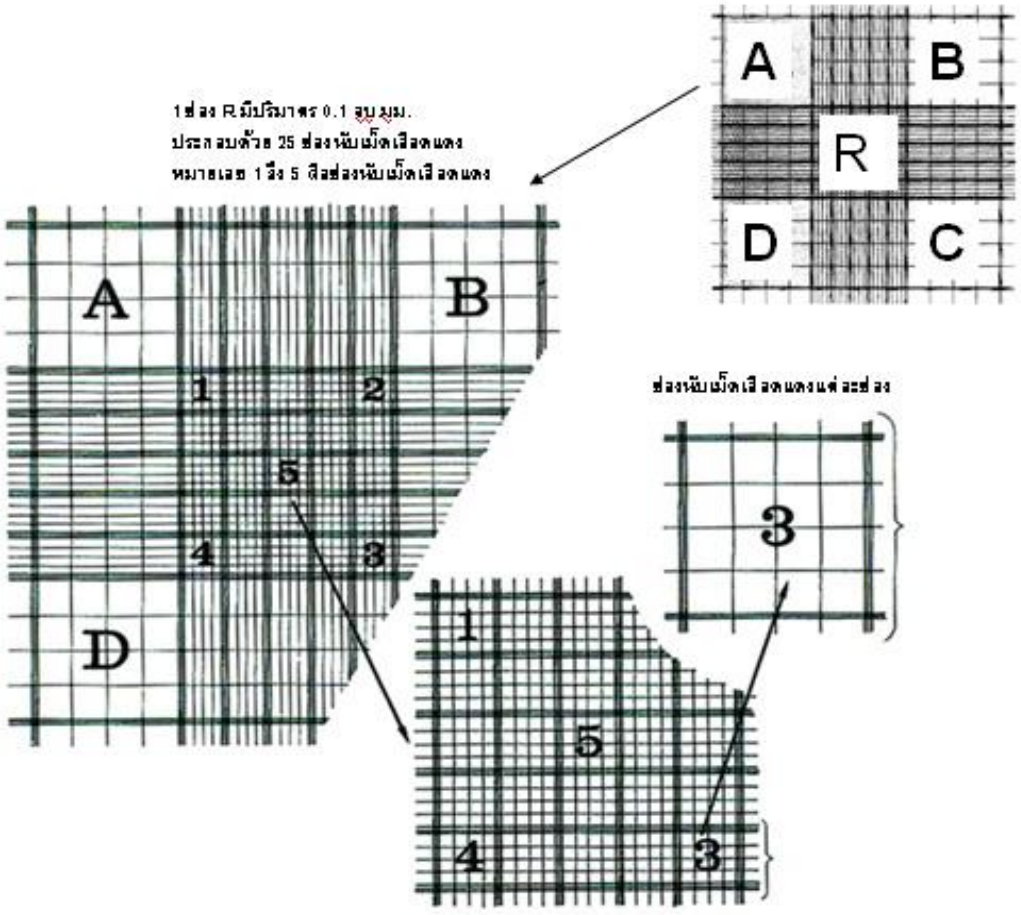
1. จะต้องผสมเลือดครบที่จะนำมาตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงให้เข้ากันดีก่อน โดยการกลับหลอดใส่เลือดขึ้นลง (invert) ประมาณ 3-5 ครั้ง (รูปที่ 7.2) ก่อนดูดเลือด
2. ผสมน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดกับเลือดให้เข้ากันดีก่อนหยอดใส่ใน counting chamber ทุกครั้ง
3. หากใช้ปิเปตต์อัตโนมัติชนิดปรับปริมาตรได้ในการเจือจางเลือด ให้เลือกใช้ขนาดที่เหมาะสมกับปริมาตรที่จะดูด เช่น ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติชนิดปรับปริมาตรได้ขนาด 0.5-10 ไมโครลิตร หรือ 2-20 ไมโครลิตร ในการดูดปริมาตร 10 ไมโครลิตร เป็นต้น ข้อควรคำนึงถึงในการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติในการเจือจางเลือด คือ ควรมีการตรวจสอบความถูกต้องของการทำงาน (calibrate) ของปิเปตต์อัตโนมัติเป็นประจำอย่างน้อยปีละครั้ง

2. **ขั้นตอนการนับเม็ดเลือด** นับเม็ดเลือดแดงบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด(hemocytometer หรือ counting chamber) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่นิยมใช้ คือ นิวบาวเออร์ (Neubauer hemocytometer) ซึ่งมีส่วนที่ใช้นับเม็ดเลือดขีดเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัส 9 ช่อง เท่า ๆ กัน แต่ละช่องมีพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร (รูปที่ 7.3) เมื่อปิดด้วยกระจกปิดทับมาตรฐาน (cover chamber) ที่ทำมาโดยเฉพาะสำหรับนับเม็ดเลือดแล้ว จะมีช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐานสูง 0.1 มิลลิเมตร เมื่อหยอดส่วนผสมของเลือดกับน้ำยาเจือจางเลือดเข้าไปในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐานอย่างถูกต้องแล้ว แต่ละช่องจะมีปริมาตรเท่ากับ 0.1 (1x1x0.1) ลบ.มม. ช่องที่ใช้นับเม็ดเลือดแดงนั้นอยู่ตรงกลาง (ช่องที่มีอักษร R ในรูปที่ 7.4) ภายในช่อง R จะแบ่งออกเป็น 25 ช่องเล็ก ในการนับเม็ดเลือดแดงจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดครบ มักจะนับเม็ดเลือดแดงใน 5 ช่องเล็ก (ที่ระบายสีดำทึบตรงส่วนหัวมุมของแต่ละช่องเล็ก และช่องเล็กที่อยู่ตรงกลาง ในรูปที่ 7.3 หรือช่องที่มีหมายเลข 1-5 กำกับอยู่ในรูปที่ 7.4) แต่หากสิ่งส่งตรวจมีเม็ดเลือดแดงไม่มากนักก็อาจนับเม็ดเลือดแดงในช่องทั้งหมด 25 ช่อง



รูปที่ 7.3 ช่องนับเม็ดเลือดแดงบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

(ดัดแปลงจาก: Rodak BF. Hematology: clinical principles and applications. 2nd ed. Philadelphia, Saunders, 2002: 155.)



รูปที่ 7.4 ภาพขยายแสดงพื้นที่ที่นับเม็ดเลือดแดงแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดชนิด Neubauer hemocytometer

(ดัดแปลงจาก: Linne JJ, Ringsrud KM. Clinical Laboratory Science: the basics and routine techniques. 4th ed. St. Louis, Mosby, 1999:315-6.)

เจือจางถึงขีด 101 ปริมาตรในกระเปาะจะเป็น 100 (รูปที่ 7.1) หรือหากใช้ปิเปตต์อัตโนมัติชนิดปรับปริมาตรได้ ก็อาจดูดน้ำยาเจือจางเม็ดเลือด 1,990 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดสอบขนาด 13 x 75 มม. และดูดเลือด 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด แล้วผสมให้เข้ากัน

การคำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดง

ในรูปที่ 7.4 จะเห็นว่าช่อง R มีปริมาตร เท่ากับ 1x1x0.1 = 0.1 ลบ.มม. และปริมาตรในช่องที่ 1, 2, 3, 4, 5 แต่ละช่องที่ใช้นับเม็ดเลือดแดงมีปริมาตร = 0.1/25 = 0.004 ลบ.มม.ดังนั้น ปริมาตรในช่องที่ 1, 2, 3, 4, 5 รวมกัน = 0.004 x 5 = 0.02 ลบ.มม. และเลือดที่นำมานับถูกเจือจางไป 200 เท่า

ดังนั้น **จำนวนเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือด/ลบ.มม.**

= (**จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในช่องที่** 1, 2, 3, 4, 5 **รวมกัน**) x $\frac{200}{0.02}$

= (**จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในช่องที่** 1, 2, 3, 4, 5 **รวมกัน**) x 10,000

= (**จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในช่องที่** 1, 2, 3, 4, 5 **รวมกัน**) x 10^4

ตัวอย่างการคำนวณ

จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในช่องที่ 1, 2, 3, 4, 5 = 75, 80, 78, 82, 80 เซลล์ตามลำดับ

จำนวนเม็ดเลือดแดงในช่องที่ 1, 2, 3, 4, 5 รวมกัน = 395 เซลล์ = 3.95×10^2 เซลล์

จำนวนเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือด = $3.95 \times 10^2 \times 10^4$ **เซลล์/ลบ.มม.**

= 3.95×10^6 **เซลล์/ลบ.มม.**

= 3.95×10^6 **เซลล์/ไมโครลิตร**

= $3.95 \times 10^6 \times 10^6$ **เซลล์/ลิตร**

= 3.95×10^{12} **เซลล์/ลิตร**

นั่นคือ

หากเจือจางเลือดไป 200 เท่า แล้วนับเม็ดเลือดแดงในช่องนับเม็ดเลือดแดง 5 ช่องเล็ก จำนวนเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือด = (ผลรวมของจำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในช่องที่ 1 ถึง 5) หารด้วย 100 แล้ว

คูณด้วย 10^6 หากตอบเป็นจำนวนเซลล์/ลบ.มม. หรือ

คูณด้วย 10^{12} หากตอบเป็นจำนวนเซลล์/ลิตร

อุปกรณ์และน้ำยาที่ใช้

1. ปิเปตต์เม็ดเลือดแดง
2. อุปกรณ์ช่วยดูด (ทำจากกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน (tuberculin syringe) ที่สวมอยู่กับสายยางพลาสติก)
3. แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐาน
4. เครื่องนับเม็ดเลือดด้วยมือ (hand tally counter)
5. น้ำยาเจือจางเม็ดเลือด อาจใช้ Gower's solution หรือ Normal saline solution ก็ได้
6. กล้องจุลทรรศน์
7. สำลีแห้งหรือผ้าก๊อซ สำหรับเช็ดทำความสะอาดแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐาน
8. เครื่องเขย่าเพื่อให้เลือดและน้ำยาเจือจางเข้ากันดี

วิธีการ

1 . สวมถุงมือ
2. สวมอุปกรณ์ช่วยดูดเข้ากับส่วนโคนของปิเปตต์เม็ดเลือดแดง
3. ผสมเลือดให้เข้ากันดี โดยการกลับหลอดเลือดขึ้นลง 3-5 ครั้ง
4. จุ่มปิเปตต์เม็ดเลือดแดงที่เตรียมไว้ในข้อ 2. ลงในหลอดเลือด ดูดเลือดโดยใช้ปิเปตต์เม็ดเลือดแดง จนถึงขีด 0.5
5. ยกปิเปตต์เม็ดเลือดแดงออกจากขวดเลือด แล้วใช้สำลีหรือผ้าก๊อซเช็ดคราบเลือดที่ติดด้านนอกปิเปตต์ออก
6. จุ่มปลายปิเปตต์เม็ดเลือดแดงลงในน้ำยาเจือจาง แล้วดูดน้ำยาตามขึ้นมา เลือดจะถูกแทนที่ด้วยน้ำยาไปเรื่อย ๆ ระหว่างที่ดูดน้ำยานี้ควรขยับปิเปตต์ไปมาด้วย ดูดน้ำยาตามจนของเหลวในกระเปาะขึ้นมาจนถึงขีด 101 ยกปิเปตต์ขึ้นจากขวดที่ใส่น้ำยาเจือจาง อุดปลายปิเปตต์เม็ดเลือดแดงไว้ แล้วถอดอุปกรณ์ช่วยดูดออกจากปิเปตต์เม็ดเลือดแดง จับปิเปตต์เม็ดเลือดแดงโดยให้ปิเปตต์อยู่ภายในอุ้งมือ ใช้นิ้วนางและนิ้วหัวแม่มืออุดปลายปิเปตต์ทั้ง 2 ด้าน เขย่าปิเปตต์เม็ดเลือดแดงด้วยมือโดยการขยับข้อมือไปมา 4-5 ครั้ง ก่อนนำไปเขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลานาน 1 นาที
7. เช็ดทำความสะอาดแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐานนำกระจกปิดทับมาตรฐานวางบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดตรงบริเวณที่กำหนด (ดูรูปที่ 7.3)
8. นำปิเปตต์ออกจากเครื่องเขย่า หยดส่วนผสมในปิเปตต์ทิ้งไป 4-5 หยด ก่อน หลังจากนั้นจึงหยดส่วนผสมในปิเปตต์ (ส่วนที่อยู่ในกระเปาะ) ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว

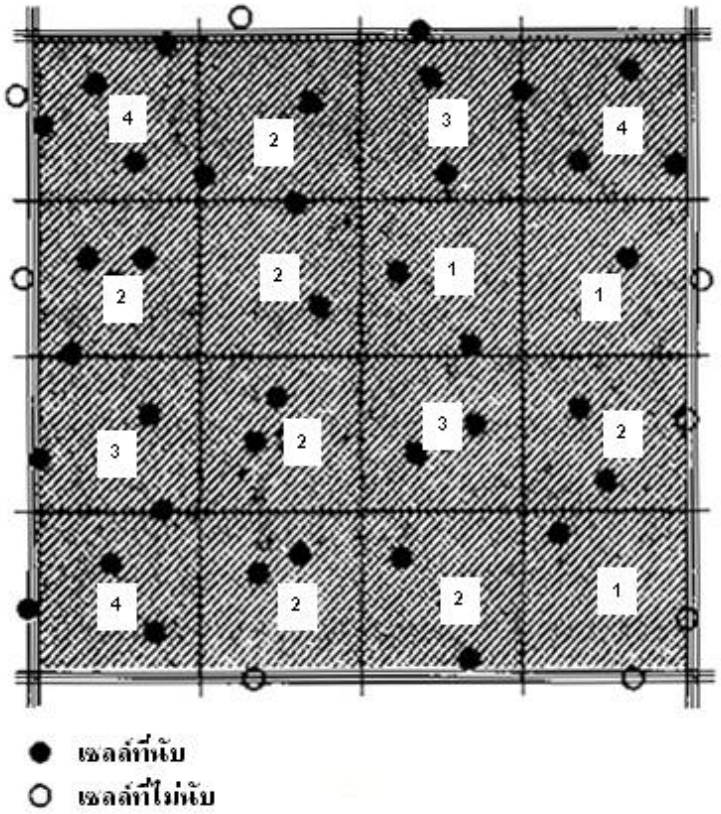
นับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐานให้เต็มพอดี รอประมาณ 1 นาที ให้เม็ดเลือดตกลงบนพื้นของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

9. นำไปนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยขั้นแรกใช้ objective lens ขนาด 10X หาบริเวณพื้นที่ที่จะใช้นับที่เห็นเป็นตาราง (ดูรูปที่ 7.3) ปรับโฟกัสให้เห็นภาพตารางอย่างชัดเจน อาจจะต้องหรี่ไดอะแฟรมของกล้องลงจนเกือบหมด เพื่อให้เห็นภาพชัด แล้วจึงค่อยเปลี่ยนเป็น objective lens ขนาด 40X นับเม็ดเลือดที่พบในช่องที่ 1, 2, 3, 4, 5 (ตามรูปที่ 7.4) โดยใช้ hand tally counter ช่วยนับ

วิธีใช้ hand tally counter

ก่อนการนับให้ปรับตัวเลขบนหน้าปัดเป็น 0000 โดยหมุนปุ่มที่มีลักษณะคล้ายสกรูที่อยู่ด้านข้าง เมื่อเริ่มนับให้กดแป้นที่ยื่นออกมาสำหรับกด 1 ครั้ง เมื่อเห็นเซลล์ที่จะนับ 1 เซลล์ ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งครบทุกเซลล์ในพื้นที่ที่ต้องการนับ hand tally counter จะรวมจำนวนครั้งที่เรากดแป้นทั้งหมด เป็นตัวเลขแสดงบนหน้าปัด นำจำนวนเลขที่แสดงบน hand tally counter มาคำนวณต่อ

โดยในแต่ละช่องที่นับเม็ดเลือดแดงที่มีหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 จะแบ่งเป็น 16 ช่องย่อย (รูปที่ 7.4) เพื่อให้ทำการนับเซลล์ได้สะดวกและถูกต้องยิ่งขึ้น นับเซลล์ทุกตัวที่อยู่ภายใน 16 ช่องย่อยดังกล่าว สำหรับเซลล์ที่อยู่บนเส้นกรอบของช่องนับเม็ดเลือดแดง มีหลักในการนับดังนี้ คือ ให้เลือกเส้นนอน 1 เส้น และเส้นตั้ง 1 เส้นของกรอบสี่เหลี่ยม เช่น หากเลือกเส้นซ้าย และบน หมายความว่า หากมีเซลล์ทับบนเส้นด้านซ้ายและเส้นบน จึงนับ หากเซลล์อยู่บนเส้นล่างและขวาจะไม่นับ เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 7.5 จะเห็นว่าเซลล์ที่นับจะแสดงด้วยจุดกลมระบายสีดำทึบของช่องนับเม็ดเลือดแดง 1 ช่อง ที่มี 16 ช่องย่อย จำนวนเซลล์ที่นับได้จากซ้ายไปขวาและบนลงล่างจะเป็นดังนี้ 4, 2, 3, 4, 2, 2, 1, 1, 3, 2, 3, 2, 4, 2, 2, 1 สำหรับเส้นขอบที่เป็นเส้น 3 เส้น จะนับเฉพาะเซลล์ที่อยู่บนเส้นกลางและเส้นใน ส่วนเซลล์ที่อยู่บนเส้นนอกจะไม่นับ



รูปที่ 7.5 เม็ดเลือดที่นับและไม่นับ

(ดัดแปลงจาก: Estridge BH, Reynolds AP, Walters NJ. Basic medical laboratory techniques. 4th ed. New York, Delmar Thomson Learning, 2000:141.)

ข้อควรระวังในการนับจำนวนเม็ดเลือดแดง

1. ความผิดพลาดของการนับอาจเกิดจากธรรมชาติของสิ่งส่งตรวจเอง เช่น มีเซลล์มากไปน้อยไป เซลล์มีขนาดเล็กและรูปร่างไม่แน่นอน ฯลฯ สิ่งส่งตรวจมีปริมาณน้อยเกินไป อุปกรณ์ที่ใช้เจือจางเลือดดูดปริมาตรไม่ถูกต้อง ใช้วิธีการตรวจวัดที่ไม่ถูกต้อง ผู้ทำการตรวจนับขาดความชำนาญ การกระจายตัวของเซลล์ในแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดไม่สม่ำเสมอ
2. ในการนับเม็ดเลือดแดง จะเห็นว่าหากนับผิดพลาดไป 1 ตัว หมายถึง 10,000 เซลล์ ดังนั้นค่าที่นับด้วยมือจึงอาจผิดพลาดได้ถึง 20%
3. เลือดที่นำมานับ ควรเจาะเก็บและใส่สารกันเลือดแข็งที่เหมาะสม (ที่นิยมใช้มาก คือ อีดีทีเอ) ไม่มีก้อนเลือดขนาดเล็กอยู่ภายในหลอด (partial clot)
4. เมื่อผสมเลือดกับน้ำยาเจือจางด้วยปิเปตต์เม็ดเลือดแดงแล้ว ก่อนหยอดส่วนผสมใส่ในแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดจะต้องทำการเขย่าปิเปตต์เพื่อให้เลือดและน้ำยาเจือจางเข้ากันดี และหยดส่วนผสมในปิเปตต์ 4-5 หยดแรกทิ้งไปก่อนทุกครั้ง ก่อนหยอดใส่แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดหากตั้งทิ้งไว้ไม่หยอดทันที เมื่อจะหยอดส่วนผสมใส่แผ่นแก้วนับเม็ด

เลือดจะต้องทำการเขย่าผสมให้เข้ากัน และหยดของเหลวในปิเปตต์ส่วนแรกทิ้งก่อนทุกครั้งเช่นกัน

5. หยอดส่วนผสมของเลือดกับน้ำยาเจือจางให้เต็มพื้นที่ที่ใช้นับเม็ดเลือดพอดี หากหยอดมากเกินไปหรือน้อยเกินไป หรือมีฟองอากาศ จะมีผลต่อความลึกของส่วนที่ใช้นับเม็ดเลือด ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาตรที่ใช้นับไม่ได้เป็นไปตามที่กำหนดไว้
6. หากเลือดที่นำมานับมีจำนวนเม็ดเลือดแดงสูงมาก อาจทำการเจือจางเลือดมากกว่า 200 เท่าได้ หรือในทางกลับกันหากจำนวนเม็ดเลือดแดงมีน้อยมาก ก็อาจลดค่าการเจือจางให้น้อยลงได้

ค่าปกติ

ชาย	4.5-5.9 $x10^6$/ลบ.มม.	หรือ	4.5-5.9 $x10^{12}$/L
หญิง	3.8-5.2 $x10^6$/ลบ.มม.	หรือ	3.8-5.2 $x10^{12}$/L

(ที่มา: McKenzie SB. Clinical laboratory hematology. New Jerse: Pearson Prentice Hall, 2004: ปกใน)

การแปลผล

ค่าสูงกว่าปกติ สามารถพบได้ในภาวะ polycythemia, burns, cardiovascular disease, erythropoietin สูง, thalassemia, hemoglobinopathy, sickle cell disease, hereditary spherocytosis, Cushing's disease

ค่าต่ำกว่าปกติ สามารถพบได้ในภาวะ Addison's disease, anemia, bone marrow suppression, hemodilution, Hodgkin's disease, chronic infection, leukemia, malaria, multiple myeloma, systemic lupus erythematosus (SLE), vitamin deficiency

การควบคุมคุณภาพ

1. ในตัวอย่างเลือดรายเดียวกัน ควรทำการตรวจนับเม็ดเลือดแดงซ้ำ 2 ครั้ง ซึ่งค่าที่ตรวจนับได้ควรใกล้เคียงกัน
2. ควรนำเลือดคนปกติมาตรวจนับไปพร้อม ๆ กัน

บรรณานุกรม

1. Estridge BH, Reynolds AP, Walters NJ. Basic medical laboratory techniques. 4th ed. New York: Delmar Thomson Learning, 2000:136-42.
2. Harmening DM. Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. 2nded. Philadelphia: F.A. Davis company, 1992:523-7.

3. Linne JJ, Ringsrud KM. Clinical Laboratory Science : the basics and routine techniques. 4th ed. St. Louis: Mosby, 1999: 313-6.
4. McKenzie SB. Clinical laboratory hematology. New Jerse: Pearson Prentice Hall, 2004:130-2.
5. Rodak BF. Hematology:clinical principles and applications. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2002: 154-5.
6. Turgeon ML. Linne & Ringsrud's Clinical laboratory science: the basic and routine techniques. 5th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007:263-6, 271-2.

9. การนับจำนวนเกล็ดเลือด

Platelet Count

นันทรัตน์ โฆมานะสิน

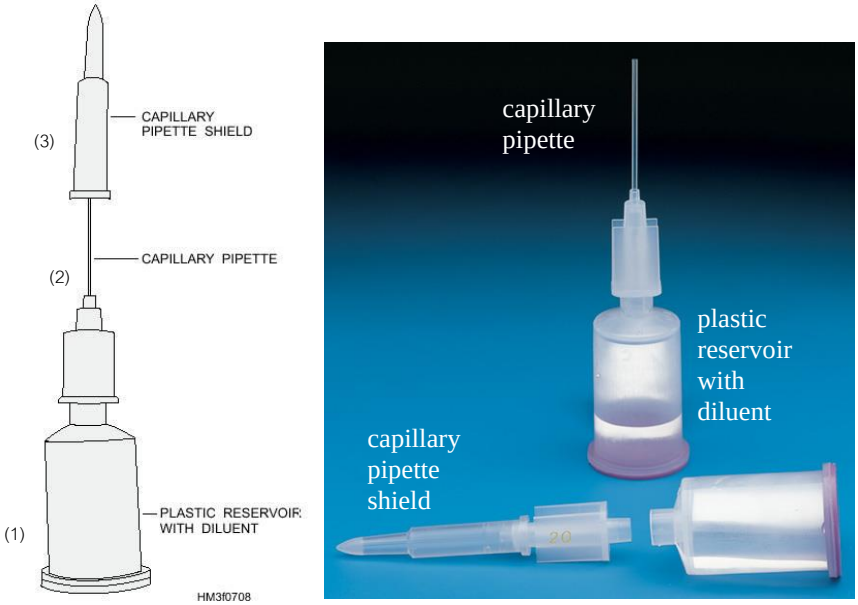
เกล็ดเลือดเป็นชิ้นส่วนของไซโทพลาซึมของเมกาคาริโอซัยท์ มีขนาดเล็ก ไม่มีนิวเคลียศ และมีแกรนูลจำนวนมากเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการห้ามเลือด ดังนั้นการนับจำนวนเกล็ดเลือดจึงเป็นการตรวจวัดที่สำคัญอย่างหนึ่งของงานทางด้านโลหิตวิทยา ซึ่งแพทย์ใช้เป็นการทดสอบกรองเพื่อช่วยในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออกผิดปกติหรือภาวะเลือดมีการแข็งตัวมากผิดปกติ ในปัจจุบันการนับจำนวนเกล็ดเลือดในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้เครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ และมักรายงานรวมอยู่ในการทำการนับเม็ดเลือดสมบูรณ์ (complete blood count; CBC) อย่างไรก็ตามการนับโดยวิธีทำด้วยมือ (manual method) ก็ยังคงใช้กันในโรงพยาบาลที่ไม่มีงบประมาณสำหรับซื้อเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ หรือแม้แต่ในโรงพยาบาลที่มีเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ ก็ยังคงต้องนับจำนวนเกล็ดเลือดด้วยวิธีแมนวลในรายที่มีค่าต่ำหรือสูงมาก ๆ ซึ่งเมื่อนับด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติอาจทำให้เกิดความผิดพลาดจากข้อจำกัดของเครื่อง นอกจากนี้ยาบางชนิดหรือการฉายแสงเพื่อรักษาโรคมะเร็งมีผลทำให้มีการสร้างเกล็ดเลือดในไขกระดูกลดลง จึงต้องติดตามการรักษาโดยการนับจำนวนเกล็ดเลือด ซึ่งจำนวนเกล็ดเลือดอาจลดลงจนต่ำมาก ๆ ดังนั้นการนับจำนวนเกล็ดเลือดจึงยังคงต้องใช้วิธีทำด้วยมือ

การนับจำนวนเกล็ดเลือดด้วยวิธีทำด้วยมือ ที่นิยมใช้กันมีอยู่ 2 วิธี ได้แก่ การนับโดยวิธีตรง (direct count) และการนับโดยวิธีอ้อม (indirect count) หรือการกะประมาณจำนวนเกล็ดเลือด (platelet estimation)

การนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยวิธีตรง

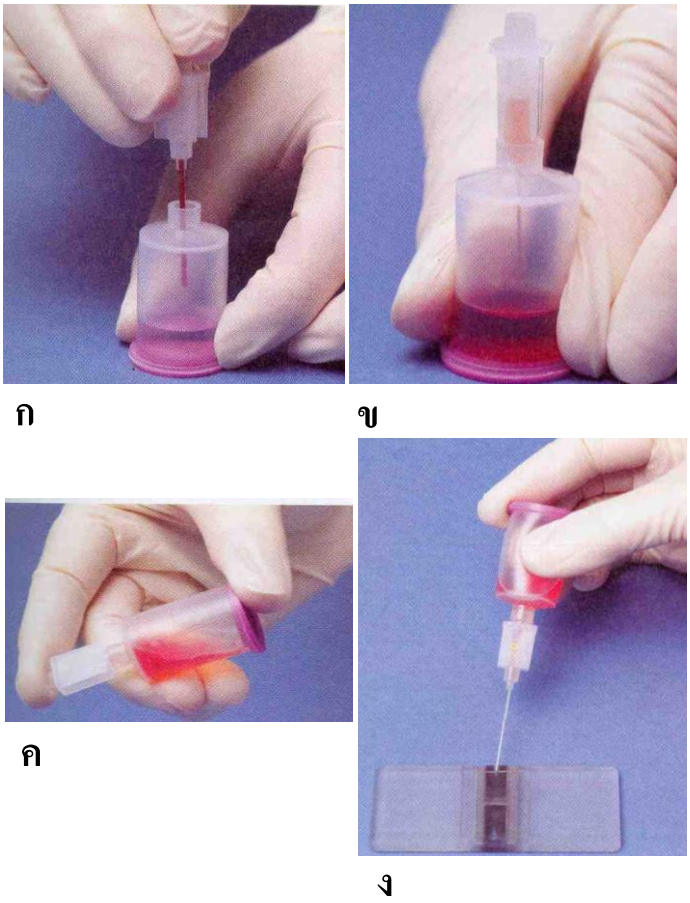
การนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยวิธีตรง เป็นการนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยตรงหลังจากเจือจางเลือดด้วยน้ำยาเจือจางเพื่อให้มีจำนวนเกล็ดเลือดที่เหมาะสมต่อการนับและเกิดข้อผิดพลาดน้อย ในขั้นตอนการเจือจาง ทำได้โดยการใช้ปิเปตต์สำหรับนับเม็ดเลือด หรือโดยยูโนเปตต์ (Unopette) ซึ่งประกอบด้วย 1) กระบอกผสมสารละลายหรือขวดพลาสติกที่มีน้ำยาแอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 1% บรรจุไว้เรียบร้อยแล้วในปริมาตร 1.98 มล. 2) ปิเปตต์แคพิลลารี (capillary) ใช้สำหรับดูดเลือด ซึ่งปรับให้ดูดเลือดได้ 20 ไมโครลิตร และ 3) อุปกรณ์ปิดปลายปิเปตต์แคพิลลารี (capillary pipette shield) ซึ่งอุปกรณ์ทั้ง 3 นี้ ประกอบกันเป็นอุปกรณ์ 1 ชุดซึ่งเป็นระบบปิด (รูปที่ 9.1) การเจือจางเลือดโดยทั้งสองวิธีนี้มีความแตกต่างกันคือ การเจือจางโดยการใช้ปิเปตต์นับเม็ดเลือดมีโอกาสผิดพลาดสูงกว่า เนื่องจากมีสองขั้นตอน คือการดูดเลือดและการดูดน้ำยาเจือจาง ในขณะที่การเจือจางโดยใช้ยูโนเปตต์ มีเพียงขั้นตอน

เดียว คือ การดูดเลือดเข้าไปในยูโนเปตต์ซึ่งบรรจุน้ำยาเจือจางไว้เรียบร้อยแล้ว ในปัจจุบันในประเทศที่พัฒนาแล้วส่วนใหญ่ใช้ยูโนเปตต์ในการเจือจางเลือดเพื่อนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยวิธีนับตรง แต่สำหรับในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทย ซึ่งมีข้อจำกัดเรื่องงบประมาณ ยังคงใช้ปิเปตต์นับเม็ดเลือดในการเจือจางเลือดเพื่อนับจำนวนเกล็ดเลือด ในที่นี้จึงจะกล่าวถึงเฉพาะการนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยใช้ปิเปตต์นับเม็ดเลือดโดยละเอียด สำหรับการใช้ยูโนเปตต์ ได้แสดงขั้นตอนการทำอย่างคร่าว ๆ ในรูปที่ 9.2



รูปที่ 9.1 ยูโนเปตต์ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ 1) กระบอกผสมสารละลายหรือขวดพลาสติกที่มีน้ำยาแอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 1% บรรจุอยู่ 2) ปิเปตต์แคพิลลารี (capillary) และ 3) อุปกรณ์ปิดปลายปิเปตต์แคพิลลารี (capillary pipette shield)

[ที่มา: http://www.tpub.com/corpsman/232.htm และ http://www.cardinal.Comusendistributedproducts ASPB4065-1.aspcat=laboratory]



ก ข

ค ง

รูปที่ 9.2 ขั้นตอนการเจือจางเลือดเพื่อนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยใช้ยูโนปิเปตต์

ก. จับส่วนกระบอกผสมสารละลายโดยออกแรงเบา ๆ เพื่อยึดกระบอกผสมสารละลายไว้กับพื้นโต๊ะ พร้อมกับใช้มืออีกข้างหนึ่งเติมเลือดจากปิเปตต์แคพิลลารีลงในกระบอกผสมสารละลาย

ข. วางปิเปตต์แคพิลลารีไว้บนปากกระบอกผสมสารละลาย แล้วปล่อยมือเที่บีบส่วนบนของปิเปตต์แคพิลลารี เพื่อปล่อยเลือดลงไปผสมกับน้ำยาในกระบอกผสมสารละลาย

ค. ผสมเลือดกับน้ำยาให้เข้ากันโดยกลับกระบอกผสมสารละลายไปมาเบา ๆ

ง. ถอดอุปกรณ์ปิดปลายปิเปตต์ออก แล้วเติมส่วนผสมของเลือดกับน้ำยาลงบนแผ่นนับเม็ดเลือดมาตรฐานที่ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดทับ

[**ที่มา**: Estridge BH, Reynolds AP. Basic clinical laboratory techniques. 5th ed. New York: Thomson Delmar Learning, 2008: 225]

การนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยวิธีตรง สามารถทำได้โดย 2 วิธีที่ใช้น้ำยาเจือจางต่างชนิดกัน ได้แก่

1. วิธี Brecher-Cronkite
2. วิธี Rees-Ecker

ข้อแตกต่างที่สำคัญของวิธีทั้งสองนี้คือ น้ำยาของวิธี Brecher-Cronkite ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แต่น้ำยาของวิธี Rees-Ecker ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และยังสามารถย้อมสีของเกล็ดเลือดด้วย ทำให้สามารถนับจำนวนเกล็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (light microscope) ได้ ในขณะที่วิธี Brecher-Cronkite จะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์ (phase contrast microscope) จึงจะให้ผลที่ถูกต้อง แต่ก็สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดาได้เช่นกัน แต่จะแยกเกล็ดเลือดออกจากสิ่งรบกวน เช่น ฝุ่น หรือแบคทีเรีย ได้ยากกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดชนิดเฟสคอนทราสต์

วิธี Brecher-Cronkite

วิธีนี้จัดเป็นวิธีอ้างอิงของการนับจำนวนเกล็ดเลือดด้วยวิธีทำด้วยมือ

หลักการ

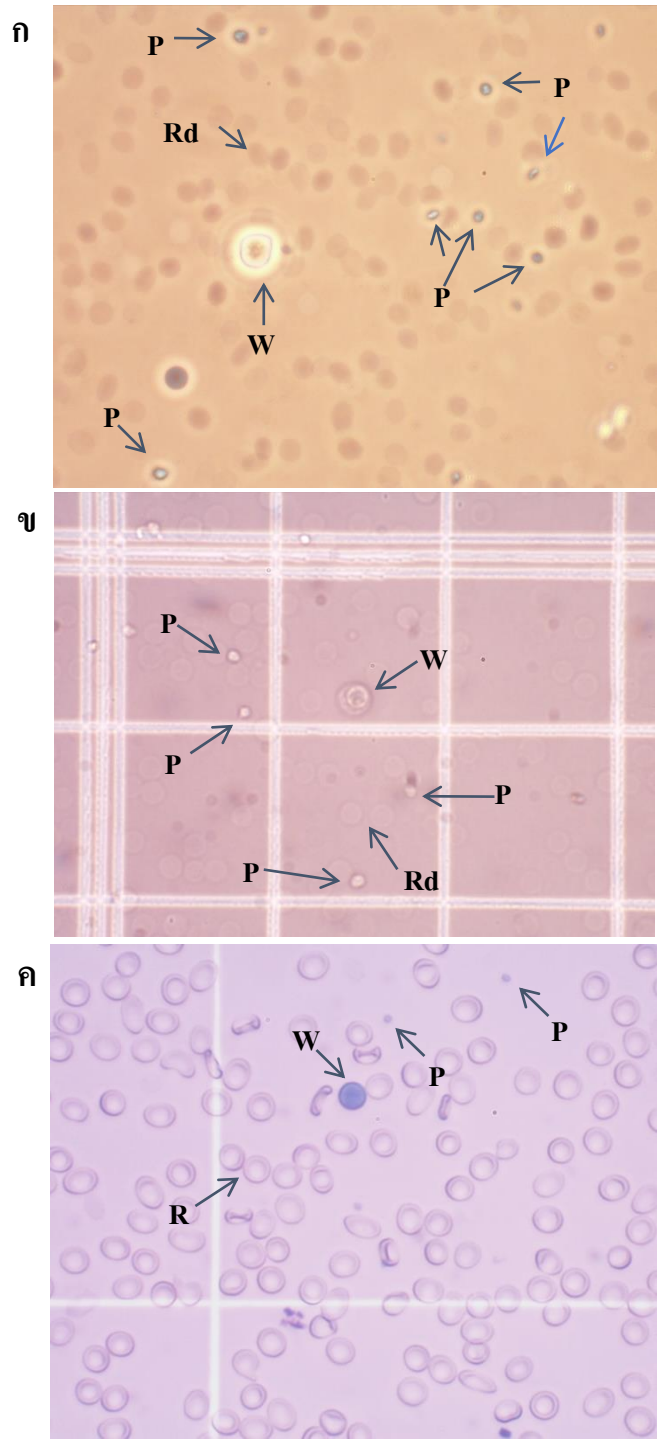
เจือจางเลือดในสัดส่วนที่เหมาะสมด้วยน้ำยาแอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 1% (1% ammonium oxalate) ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แต่ไม่ทำให้เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดแตก จากนั้นนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์หรือกล้องจุลทรรศน์ชนิธรรมดา เกล็ดเลือดมีรูปร่างกลม รี หรือเป็นแท่งสะท้อนแสงปานกลาง โดยจะพบลักษณะเป็นแสงสีเขียว (รูปที่ 9.3 ก) ซึ่งเป็นลักษณะที่แยกเกล็ดเลือดออกจากเศษฝุ่นที่อาจติดมากับแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดหรือกระจกปิดทับมาตรฐานหรือน้ำยาเจือจาง รวมทั้งแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาในน้ำยาเจือจาง ที่มีการสะท้องแสงมากและไม่มีลักษณะเป็นแสงสีเขียว สำหรับเม็ดเลือดแดงมีลักษณะเป็นเศษเซลล์ (ghost cell) จำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้บนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดซึ่งทราบปริมาตรที่แน่นอน สามารถนำมาคำนวณกลับเป็นจำนวนเกล็ดเลือดในเลือดได้

น้ำยา

น้ำยาเจือจางของวิธี Brecher-Cronkite ได้แก่ แอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 1% ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

- ammonium oxalate ($C_2H_8N_2O_4.2H_2O$) 1.0 ก.
- เติมน้ำกลั่นจนครบ 100.0 มล.

เก็บน้ำยาในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย ควรแบ่งน้ำยาใส่ขวดเล็กเพื่อนำไปใช้ และต้องกรองก่อนใช้ทุกครั้ง



รูปที่ 9.3 ลักษณะของเกล็ดเลือดที่พบจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสท์เมื่อนับด้วยวิธี Brecher & Cronkite (ก) และจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา เมื่อนับโดยใช้วิธี Brecher & Cronkite (ข) และวิธี Rees & Ecker (ค)

P: เกล็ดเลือด, R: เม็ดเลือดแดง, Rd: เศษเม็ดเลือดแดง, W: เม็ดเลือดขาว

วิธี Rees-Ecker

หลักการ

เจือจางเลือดในสัดส่วนที่เหมาะสมด้วยน้ำยาเจือจางที่มีสี brilliant cresyl blue เป็นส่วนประกอบ ซึ่งสีนี้จะย้อมเกล็ดเลือดเป็นสีน้ำเงิน โดยไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา ซึ่งเกล็ดเลือดมีรูปร่างกลม หรือรี มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดง ติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 9.3 ข) จำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้บนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดซึ่งทราบปริมาตรแน่นอน สามารถนำมาคำนวณกลับเป็นจำนวนเกล็ดเลือดในเลือดได้

น้ำยา

น้ำยาเจือจางของวิธี Rees-Ecker มีส่วนประกอบดังนี้

- sodium citrate	($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	3.8	ก.
- brilliant cresyl blue		0.1	ก.
- formaldehyde (37%)		0.2	มล.
- เติมน้ำกลั่นจนครบ		100.0	มล.

เก็บน้ำยาในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย ควรแบ่งน้ำยาใส่ขวดเล็กเพื่อนำไปใช้ และต้องกรองก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

สำหรับอุปกรณ์ สิ่งส่งตรวจ และวิธีการของการนับจำนวนเกล็ดเลือด ของทั้ง 2 วิธีเหมือนกัน ดังนี้

อุปกรณ์

1. ปิเปตต์สำหรับนับจำนวนเม็ดเลือดแดง
2. อุปกรณ์สำหรับดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็ก
3. แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดพร้อมด้วยกระจกปิดทับมาตรฐาน
4. จานเพาะเชื้อ (Petri dish) สำหรับทำ moist chamber
5. เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด
6. กล้องจุลทรรศน์

สิ่งส่งตรวจ

ในกรณีที่เป็นเลือดเจาะจากหลอดเลือดดำ สารกันเลือดแข็งที่เหมาะสมได้แก่ อีดีทีเอ เพราะสามารถป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ และในกรณีที่เป็นเลือดที่เจาะจากหลอดเลือดฝอย ควรใช้เลือดที่ไหลอย่างอิสระหยดที่สองหลังจากที่เช็ดเลือดหยดแรกทิ้งแล้ว และควรรีบดูดเลือดทันทีที่เลือดไหลออกจากบาดแผลที่เจาะ เพื่อป้องกันไม่ให้เกล็ดเลือดมีการเกาะติด และเกาะกลุ่มบริเวณบาดแผล

วิธีการ

1. ผสมเลือดในขวดที่มี อีดีทีเอ เป็นสารกันเลือดแข็งให้เข้ากันดี

2. ดูดเลือดเข้าสู่ปิเปตต์สำหรับนับเม็ดเลือดแดงให้ถึงขีด 1 พอดี ถ้าเป็นเลือดที่เจาะจากปลายนิ้วควรดูดน้ำยาเจือจางเข้าไปเคลือบปิเปตต์ก่อน โดยดูดน้ำยาเจือจางถึงขีด 1 แล้วปล่อยน้ำยาออกจนหมด จากนั้นจึงดูดเลือดถึงขีด 1 พอดี

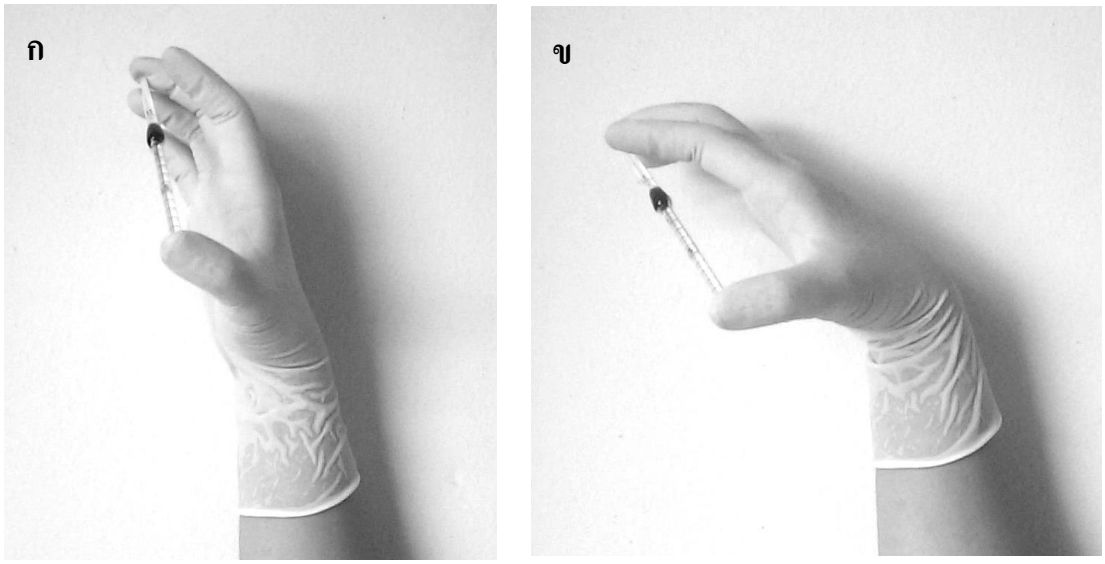
3. เช็ดรอบนอกของปิเปตต์ให้สะอาด ถ้าดูดเลือดเกินขีด 1 ขึ้นมาเล็กน้อย (ไม่เกิน 2 มม.) ให้ปรับมาที่ขีด 1 โดยใช้ผ้าก๊อซหรือกระดาษซับที่สะอาดแตะที่ปลายปิเปตต์ และจับปิเปตต์ให้อยู่ในลักษณะเป็น **แนวราบ** แต่ถ้าดูดเลือดเกินขีด 1 มาก (อาจจะเข้าไปในกระเปาะ) ให้รีบล้างปิเปตต์ด้วยน้ำสะอาดทันที หรือดูดน้ำยาเจือจางจนถึงขีด 101 แล้วจึงล้างให้สะอาด เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแห้งติดหรืออุดตันปิเปตต์ จากนั้นใช้ปิเปตต์อันใหม่ดูดเลือดอีกครั้งหนึ่ง

4. ดูดน้ำยาเจือจางถึงขีด 101 โดยจับปิเปตต์ให้อยู่ในลักษณะเกือบเป็น**แนวตั้ง** (รูปที่ 9.4) เพื่อป้องกันไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในกระเปาะของปิเปตต์

5. จับปิเปตต์ให้อยู่ในลักษณะเป็น**แนวราบ** ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตต์ไว้ แล้วถอดอุปกรณ์ดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็กออก

6. จับปิเปตต์โดยปิดปลายทั้งสองข้างด้วยนิ้วหัวแม่มือและนิ้วกลาง แล้วสบัดข้อมือไปมานาน 3-5 นาที (รูปที่ 9.5) หรือเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือดเพื่อผสมน้ำยาเจือจางและเลือดให้เข้ากันดี

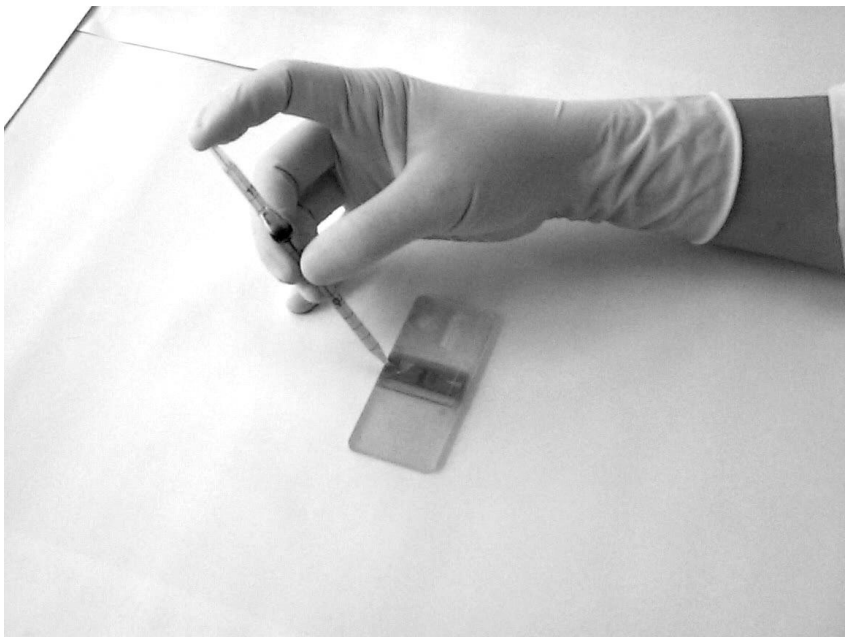
รูปที่ 9.4 ดูดน้ำยาเจือจางสำหรับการนับจำนวนเกล็ดเลือดถึงขีด 101 โดยจับปิเปตต์ให้อยู่ในลักษณะเกือบเป็น**แนวตั้ง**



รูปที่ 9.5 ผสมเลือดกับน้ำยาเจือจางในปิเปตต์นับเม็ดเลือดด้วยการจับปิเปตต์โดยปิดปลายทั้งสองข้างด้วยนิ้วหัวแม่มือและนิ้วกลาง แล้วสะบัดข้อมือไป (ก) มา (ข) นาน 3-5 นาที

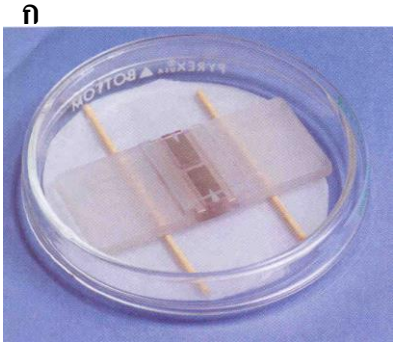
7. หยดสารละลาย 1-2 หยดแรกทิ้งไป เพราะเป็นส่วนของน้ำยาเจือจางในส่วนก้านของปิเปตต์ ที่ไม่ได้ผสมกับเลือดที่ดูดเข้าไปในกระเปาะของปิเปตต์

8. หยดสารละลายหยดต่อไปลงตรงร่องของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่ปิดด้วยกระจกปิดทับมาตรฐานไว้เรียบร้อยแล้วทั้ง 2 ข้าง (รูปที่ 9.6) แล้วนำไปวางใน moist chamber (รูปที่ 9.7) ได้แก่ จานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรองหรือกระดาษซับหรือสำลีแผ่นบาง ๆ ชุบน้ำให้เปียกพอประมาณวางอยู่ที่ส่วนฝาของจานเพาะเชื้อ ปิดฝา moist chamber ตั้งไว้นาน 15 นาที เพื่อให้เกล็ดเลือดตกอยู่ในระนาบเดียวกัน

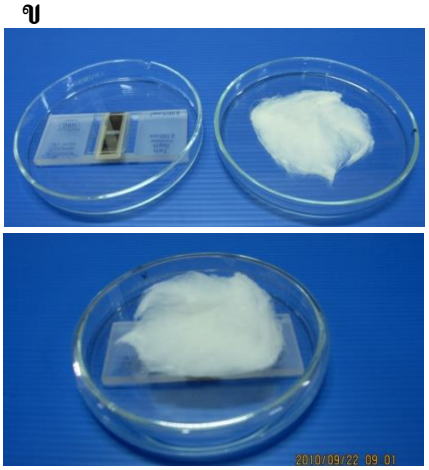


รูปที่ 9.6 หยดสารละลายหยดต่อไปลงตรงร่องของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่ปิดด้วยกระจกปิดทับมาตรฐานไว้เรียบร้อยแล้วทั้ง 2 ข้าง

ก



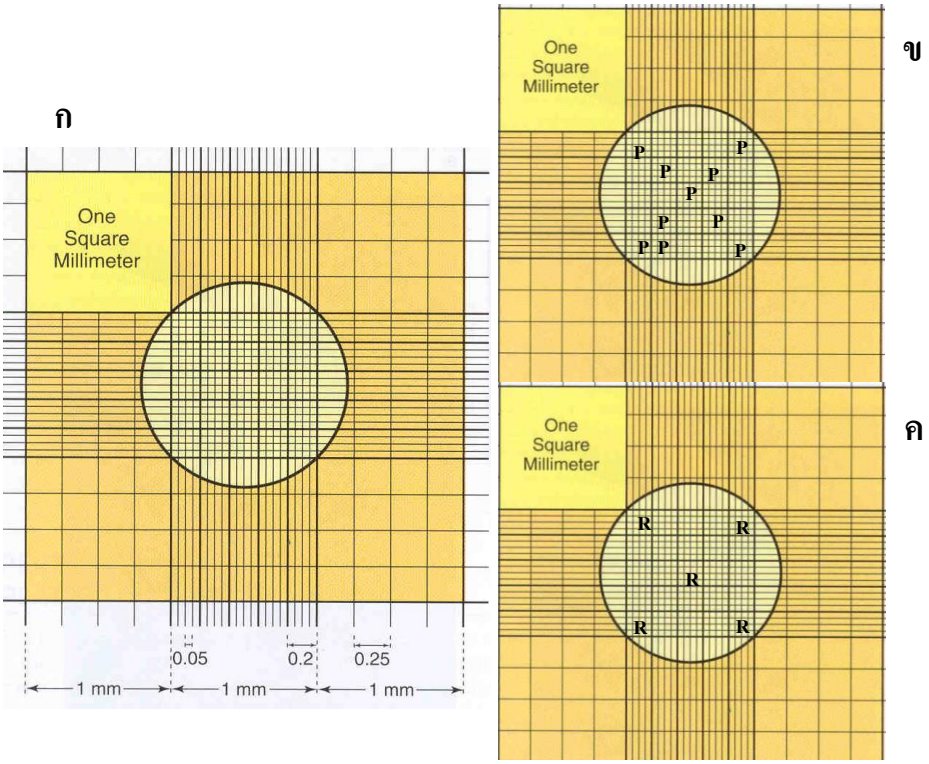
ข



รูปที่ 9.7 moist chamber ที่เตรียมโดยมีกระดาษกรอง สำลี หรือกระดาษซับที่ชุบน้ำหมาด ๆ วางอยู่ในจานเพาะเชื้อเพื่อทำให้เกิดความชื้น ซึ่งหากวางกระดาษหรือสำลีชุบน้ำไว้ในส่วนฐานของจานเพาะเชื้อ ไม่ควรให้สัมผัสกับแผ่นแก้วมาตรฐานโดยตรง (ก) แนะนำให้วางกระดาษหรือสำลีชุบน้ำไว้ที่ส่วนฝาของจานเพาะเชื้อแทน (ข) ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้ส่วนฐานของแผ่นแก้วมาตรฐานมีความชื้นก่อนที่จะนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

[ที่มาของรูป ก: Estridge BH, Reynolds AP. Basic clinical laboratory techniques. 5th ed. New York, Thomson Delmar Learning, 2008: 226]

9. เมื่อครบเวลา นำแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดวางที่กล้องจุลทรรศน์ ใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10X เพื่อหาตารางที่ใช้นับเม็ดเลือดแดง แล้วใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40X นับจำนวนเกล็ดเลือดในตารางที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้ง 25 ช่อง ของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดทั้ง 2 ข้าง (รูปที่ 9.8) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เมื่อใช้น้ำยาเจือจางของวิธี Rees-Ecker หรือใช้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ เมื่อใช้แอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 1% เป็นน้ำยาเจือจาง และควรหรี่ไดอะแฟรม และลดคอนเดนเซอร์ เพื่อลดปริมาณแสงที่ผ่านเข้ากล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 9.8 บริเวณบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดมาตรฐานที่ใช้ในการนับจำนวนเกล็ดเลือด คือ 25 ช่องเล็กตรงกลางที่ใช้ในการนับเม็ดเลือดแดง (บริเวณในวงกลม) (ก) หรือนับ 10 ช่อง P (ข) หรือ 5 ช่อง R (ค) ในกรณีที่มีจำนวนเกล็ดเลือดสูงมาก

[**ที่มา**: Estridge BH, Reynolds AP. Basic clinical laboratory techniques. 5th ed. New York: Thomson Delmar Learning, 2008: 226]

การคำนวณ

$$\text{จำนวนเกล็ดเลือด/ล.} = \frac{N \times \text{dilution factor} \times 10^6}{\text{ปริมาตรที่ใช้นับ (ไมโครลิตร)}}$$

N = จำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ข้างของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

ปริมาตรที่ใช้นับ = พื้นที่ x ความลึก x จำนวนช่องที่นับ

= (0.2x0.2) x 0.1 x 25

= 0.01 ลบ.มม.

หรือ = 0.01 ไมโครลิตร

dilution factor คำนวณได้ดังนี้

ในการเจือจางเลือด ดูดเลือดถึงขีด 1 แล้วดูดน้ำยาเจือจางถึงขีด 101 ซึ่งมีส่วนที่เป็นเลือดผสมกับน้ำยาเพียง 100 ส่วนในกระเปาะของปิเปตต์ อีก 1 ส่วนที่ก้านของปิเปตต์เป็นส่วนที่มีเฉพาะน้ำยา ซึ่งเป็นส่วนที่ปล่อยทิ้งก่อนที่จะหยดสารละลายในกระเปาะไปนับจำนวนเกล็ดเลือด ดังนั้นเลือดจึงถูกเจือจางไป 1:100 เท่า นั่นแสดงว่า dilution factor (ส่วนกลับของ dilution) = 100

ดังนั้น

$$\text{จำนวนเกล็ดเลือด/ล.} = \frac{N \times 100 \times 10^6}{0.01}$$

$$= N \times 1{,}000 \times 10^6 \text{ /ล.}$$

การควบคุมคุณภาพ

1. การตรวจซ้ำ

การนับเกล็ดเลือดด้วยวิธีทำด้วยมือมีความคลาดเคลื่อนสูง ตัวอย่างเลือดแต่ละรายจึงควรทำการตรวจซ้ำ โดยเจือจางตัวอย่างเลือดรายละ 2 ครั้ง และนับเกล็ดเลือดซ้ำ 2 ครั้ง แต่ในการปฏิบัติจริงอาจเป็นการเพิ่มภาระงานมากเกินไป ดังนั้นอย่างน้อยจึงควรนับเกล็ดเลือดบนแก้วนับเม็ดเลือดแดงทั้ง 2 ข้าง โดยจำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้ไม่ควรแตกต่างกันมากกว่า 10 %

2. การประเมินค่าความเป็นไปได้ของการตรวจวัด

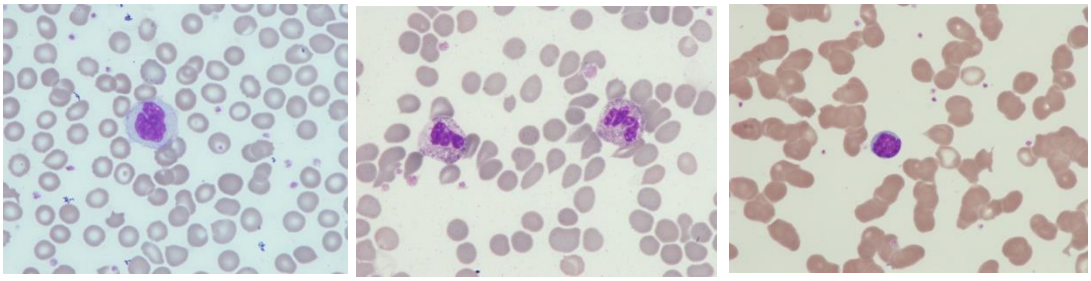
จำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้ด้วยวิธีทำด้วยมือนี้ควรสอดคล้องกับจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจพบบนสเมียร์ที่ย้อมสีไรท์ ดังนั้นในการนับเกล็ดเลือดทุกครั้งจึงจำเป็นต้องเตรียมสเมียร์เลือดของตัวอย่างเลือดรายนั้น ๆ ควบคู่ไปด้วยเสมอ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับจำนวนเกล็ดเลือดนับได้ โดยสามารถประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจากสเมียร์เลือดดังที่จะกล่าวต่อไป

การนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยวิธีอ้อมหรือการกะประมาณจำนวนเกล็ดเลือด

การนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยวิธีอ้อม เป็นการกะประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจากสเมียร์เลือดที่ย้อมด้วยสีไรท์ แล้วคำนวณเป็นจำนวนเกล็ดเลือด/ล. หรือ จำนวนเกล็ดเลือด/ไมโครลิตรโดยคูณด้วยค่าคงที่

วิธีการ

1. เลือกบริเวณที่เป็น examination area จากสเมียร์เลือดที่ย้อมด้วยสีไรท์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100X ซึ่งเป็นบริเวณที่เม็ดเลือดแดงมีการกระจายตัวไม่หนาหรือบางเกินไป โดยพบบริเวณที่ติดสีชีดตรงกลางของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงมีการเรียงตัวชิดกันเป็นชั้นเดียว ไม่ซ้อนทับกัน และมีจำนวนเม็ดเลือดแดงประมาณ 200 เซลล์/oil field (รูปที่ 9.9)



ก. ข. ค.

รูปที่ 9.9 การกระจายตัวของเม็ดเลือดแดงในสเมียร์เลือด

ก. เป็นบริเวณที่เหมาะสมในการกะประมาณจำนวนเกล็ดเลือด ซึ่งเม็ดเลือดแดงมีลักษณะที่มีบริเวณติดสีซีดตรงกลาง มีการเรียงตัวชิดกันเป็นชั้นเดียว ไม่ซ้อนทับกัน และมีจำนวนเม็ดเลือดแดงประมาณ 200 เซลล์/oil field เป็นบริเวณที่เหมาะสมในการกะประมาณจำนวนเกล็ดเลือด

ข. เป็นบริเวณที่บางเกินไป เม็ดเลือดแดงมีการกระจายอยู่ห่างกัน และเม็ดเลือดแดงไม่มีลักษณะของบริเวณที่ติดสีซีดตรงกลาง

ค. เป็นบริเวณที่หนาเกินไป เม็ดเลือดมีการเรียงตัวซ้อนทับกันมาก

2. นับจำนวนเกล็ดเลือดที่มีลักษณะกลมหรือรี ภายในมีแกรนูลติดสีชมพู อย่างน้อย 10 oil fields แล้วเฉลี่ยเป็นจำนวนเกล็ดเลือดต่อ 1 oil field

3. คำนวณเป็นจำนวนเกล็ดเลือด/ล. โดยคูณด้วย 20,000 ซึ่งเป็นการกะประมาณว่าเกล็ดเลือด 1 ตัว/oild field มีค่าประมาณ 20,000 ตัว/ไมโครลิตร เมื่อจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ยในแต่ละ oil filed มีประมาณ 200 เซลล์/oil field

ตัวอย่างการคำนวณ

นับจำนวนเกล็ดเลือดได้ = 200 ตัว/10 oil fields

จำนวนเกล็ดเลือด/oil field = 200/10 = 20 ตัว/oil field

ดังนั้นจำนวนเกล็ดเลือด/ล. = $20 \times 20{,}000 \times 10^6$ ตัว/ล.

= $400{,}000 \times 10^6$/ ล.หรือ 400×10^9/ ล.

สำหรับในกรณีที่ผู้ป่วยมีความผิดปกติในปริมาณของเม็ดเลือดแดง เช่น ผู้ป่วยที่มีภาวะซีดที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปกติ หรือผู้ป่วย polycythemia vera ที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงมากผิดปกติ ในกรณีเหล่านี้ จำนวนเม็ดเลือดแดง/oil field จะน้อยกว่าหรือมากกว่า 200 เซลล์ ซึ่งจะไม่สัมพันธ์กับค่าคงที่ 20,000 ที่ใช้ปรับค่าจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้มาจากการกะประมาณจากบริเวณที่มีเม็ดเลือดแดงประมาณ 200 เซลล์/oil field จึงต้องคำนวณจำนวนเกล็ดเลือดจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเกล็ดเลือด/ล.} = \frac{\text{จำนวนเกล็ดเลือดเฉลี่ย/oil field} \times \text{จำนวนเม็ดเลือดแดง/ล.}}{}$$

200 (จำนวนเม็ดเลือดแดง/oil field)

ตัวอย่างการคำนวณ

นับจำนวนเกล็ดเลือดได้ = 50 ตัว/10 oil fields

จำนวนเกล็ดเลือด/oil field = 50/10 = 5 ตัว/oil field

จำนวนเม็ดเลือดแดง = 2.0×10^{12}/ล. หรือ 2,000,000/ไมโครลิตร

ดังนั้นจำนวนเกล็ดเลือด/ล. = $\frac{5 \times 2.0 \times 10^{12}}{200}$ ตัว/ล.

= 50×10^{9} ตัว/ล.

ซึ่งหากไม่ได้คำนวณโดยใช้สูตรที่ปรับด้วยจำนวนเม็ดเลือดแดงนี้

จะได้จำนวนเกล็ดเลือด = 5 x 20,000 = 100,000/ไมโครลิตร หรือ = 100×10^{9} /ล.

ซึ่งค่าจะสูงกว่าค่าที่แท้จริง

ค่าปกติ

เด็กแรกเกิดที่มีอายุ ≤1 สัปดาห์ = 84-478x10^{9}/ล. (84,000-478,000/ลบ.มม. หรือ 84,000-478,000/ไมโครลิตร)

เด็กแรกเกิดที่มีอายุ >1 สัปดาห์ จนถึงผู้ใหญ่ = 140-400x10^{9}/ล. (140,000-400,000/ลบ.มม. หรือ 140,000-400,000/ไมโครลิตร)

(ที่มา Addison LA, Fischer PM. The office laboratory. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1990: 187)

การแปลผล

การนับจำนวนเกล็ดเลือดมีประโยชน์ในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออกผิดปกติ ซึ่งมีสาเหตุจากความผิดปกติในเชิงปริมาณของเกล็ดเลือด โดยอาจจะมีปริมาณน้อยหรือมากกว่าปกติถ้ามีปริมาณเกล็ดเลือดน้อยกว่าปกติ (น้อยกว่า 100x10^{9}/ล. หรือ 100,000/ไมโครลิตร) เรียกภาวะนั้นว่า ภาวะพร่องเกล็ดเลือด (thrombocytopenia) ถ้ามีปริมาณเกล็ดเลือดมากกว่าปกติ (มากกว่า 400x10^{9}/ล. หรือ 400,000/ไมโครลิตร) เรียกภาวะนั้นว่า ภาวะเกล็ดเลือดเกิน (thrombocytosis)

ภาวะพร่องเกล็ดเลือดพบได้ในโรคต่อไปนี้

1. immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura (ITP)
2. hemolytic uremic syndrome (HUS)
3. thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)
4. disseminated intravascular coagulation (DIC)
5. aplastic anemia (AA)

6. มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia)

7. ภาวะที่มีม้ามโต (splenomegaly)

ซึ่งถ้าหากผู้ป่วยมีจำนวนเกล็ดเลือดน้อยกว่า 10 - 20x10^9/ล. (<10,000-20,000/ไมโครลิตร) มักจะเกิดภาวะเลือดออกเอง (spontaneous bleeding) โดยไม่ได้รับการกระทบกระแทกแต่อย่างใด สำหรับจำนวนเกล็ดเลือดที่เพียงพอสำหรับการห้ามเลือด (hemostatic level) ควรจะมากกว่า 60x10^9/ล. (>60,000/ไมโครลิตร)

ภาวะเกล็ดเลือดเกินพบได้ในโรคต่อไปนี้

1. myeloproliferative disorders ได้แก่ polycythemia vera, essential thrombocythemia, chronic myelogenous leukemia และ myelofibrosis ซึ่งโรคในกลุ่มนี้มักมีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า 600x10^9/ล. (>600,000/ไมโครลิตร)

2. ภาวะหลังตัดม้าม (post-splenectomy)

3. การอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง

ในผู้ป่วยที่มีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า 1,000x10^9/ล. (>1,000,000/ไมโครลิตร) มักพบว่ามีภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด (thrombosis) และ/หรือภาวะเลือดออกผิดปกติเกิดขึ้นเองได้

นอกจากพยาธิสภาพดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในภาวะที่ไม่เป็นโรคมีผลต่อปริมาณเกล็ดเลือด โดยผู้หญิงจะมีปริมาณเกล็ดเลือดสูงกว่าผู้ชายประมาณ 20% และผู้หญิงในระยะใกล้มีประจำเดือนจะมีปริมาณเกล็ดเลือดลดลง โดยมีรายงานพบว่าปริมาณเกล็ดเลือดจะลดลงทุก ๆ 21-35 วัน ผู้ที่ออกกำลังกายอย่างหนัก มีผลทำให้ปริมาณเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้น 30-40% เชื่อว่าเป็นผลมาจากการปล่อยเกล็ดเลือดออกมาจากแหล่งเก็บสะสม คือ ม้าม มากขึ้น นอกจากนี้เชื้อชาติและอายุก็มีผลต่อปริมาณเกล็ดเลือดเล็กน้อย เท่าที่มีรายงาน คือ ชาวอินเดียตะวันตก (West Indians) และชาวอาฟริกัน (Africans) มีปริมาณเกล็ดเลือดต่ำกว่าชาวยุโรป (Europeans) ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน และพบว่าเด็กแรกเกิดและทารกอายุ 2-3 สัปดาห์ จะมีปริมาณเกล็ดเลือดต่ำกว่าผู้ใหญ่ปกติ โดยปริมาณเกล็ดเลือดจะเพิ่มขึ้นสู่ระดับปกติภายใน 6 เดือน

หมายเหตุ

1. ในการนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยวิธีตรงทุกครั้ง ควรจะทำสเมียร์เลือดแล้วย้อมด้วยสีไรท์เพื่อเป็นการตรวจสอบผลการนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยวิธีตรง ซึ่งค่าจากทั้งสองวิธีควรสอดคล้องกัน

2. เลือดที่ใช้อีดีทีเอเป็นสารกันเลือดแข็ง ควรเจือจางเลือดเพื่อนับจำนวนเกล็ดเลือดภายในเวลา 5 ชั่วโมง ถ้าเก็บเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าเก็บเลือดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ้าหากเจือจางเลือดด้วยน้ำยาแอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 1% สารละลายนี้สามารถอยู่ได้นาน 8 ชั่วโมง แต่ถ้าหากเจือจางเลือดด้วยน้ำยาของวิธี Rees-Ecker ต้องรีบทำให้เสร็จภายในเวลา 30 นาที เพื่อป้องกันการแตกสลายของเกล็ดเลือด

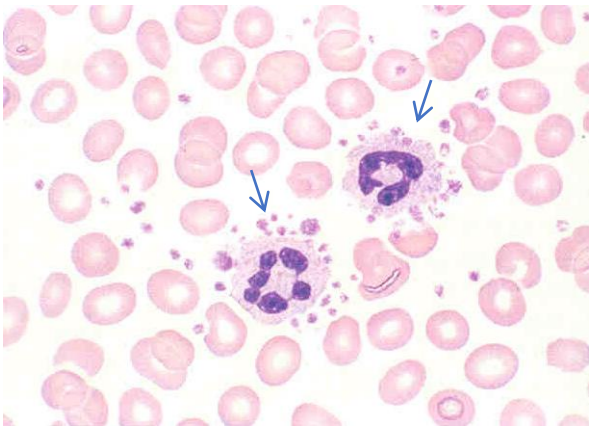
3. หลังจากผสมเลือดและน้ำยาเจือจางในปิเปตต์แล้วให้รีบหยดสารละลายไปนับจำนวนเกล็ดเลือด ไม่ควรทิ้งไว้นานเกิน 8-10 วินาที ถ้าหากหลังจากนี้ ควรจะผสมให้เข้ากันใหม่ ก่อนหยดสารละลายนี้ไปนับจำนวนเกล็ดเลือด

4. ในการนับจำนวนเกล็ดเลือดแต่ละครั้ง ควรจะนับได้มากกว่า 200 ตัว/25 ช่องที่ใช้นับ เพื่อลดความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้น ถ้าหากนับได้น้อยกว่านี้ควรเพิ่มพื้นที่ในการนับเกล็ดเลือด และถ้านับได้น้อยกว่า 50 ตัว ควรทำการเจือจางเลือดเป็น 1:20 โดยใช้ปิเปตต์สำหรับนับเม็ดเลือดขาว ซึ่งในกรณีนี้ไม่ควรเจือจางเลือดด้วยน้ำยาเจือจางของวิธี Rees-Ecker เพราะน้ำยาไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง ดังนั้นเม็ดเลือดแดงที่มีอยู่เป็นจำนวนมากจะบดบังเกล็ดเลือด ทำให้ค่าที่นับได้คลาดเคลื่อนจากค่าที่แท้จริงมาก แต่ถ้าจำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้สูงมาก โดยนับได้มากกว่า 500 ตัว/25 ช่องที่ใช้นับ ควรจะเจือจางเลือดเป็น 1:200 หรือลดพื้นที่ในการนับเกล็ดเลือด เช่น นับในตารางนับเม็ดเลือดแดง 10 ช่อง ซึ่งทำได้ 2 วิธี วิธีแรก นับในตารางนับเม็ดเลือดแดง 10 ช่อง (P) (รูปที่ 9.7 ข) วิธีที่ 2 นับในตารางนับเม็ดเลือดแดง 5 ช่อง (R) (รูปที่ 9.7 ค) เช่นเดียวกับการนับเม็ดเลือดแดง โดยนับทั้ง 2 ข้างของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดรวมกันเป็น 10 ช่อง

5. ผลการนับจำนวนเกล็ดเลือด จากแต่ละข้างของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด ไม่ควรแตกต่างกันมากกว่า 10% ซึ่งพบว่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; CV) ของการนับจำนวนเกล็ดเลือดอยู่ในช่วง 8-10%

6. เนื่องจากเกล็ดเลือดมีขนาดเล็ก ลักษณะแยกได้ยากจากฝุ่น เศษเซลล์ หรือแบคทีเรีย ดังนั้นอุปกรณ์ที่ใช้ได้แก่ แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด กระจกปิดทับมาตรฐาน จะต้องสะอาดปราศจากฝุ่น ซึ่งก่อนการหยดสารละลาย ควรเช็ดด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% แล้วเช็ดให้แห้งด้วยผ้าก๊อซที่สะอาดก่อนเสมอ และเพื่อให้มั่นใจว่าปราศจากฝุ่น ควรสองดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40X หากพบว่าว่ายังมีการปนเปื้อน ให้ทำความสะอาดซ้ำ หรือเพิ่มขั้นตอนการทำความสะด้วยน้ำสบู่ก่อนเช็ดด้วย 95% แอลกอฮอล์ สำหรับน้ำยาที่ใช้จะต้องกรองก่อนใช้ทุกครั้ง และเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าที่ได้สูงกว่าค่าที่แท้จริง

7. ในกรณีที่ใช้ อีดีทีเอ เป็นสารกันเลือดแข็ง อาจพบ platelet setellitosis ซึ่งเป็นลักษณะที่เกล็ดเลือดเกาะอยู่รอบ ๆ นิวโทรฟิล (รูปที่ 9.10) จะมีผลทำให้นับจำนวนเกล็ดเลือดผิดพลาดได้ ในกรณีนี้แนะนำให้ใช้โซเดียมซิเตรทเป็นสารกันเลือดแข็งแทน แล้วปรับค่าที่ได้ด้วยการคูณ 1.1 เนื่องจากโซเดียมซิเตรทที่ใช้เป็นสารกันเลือดแข็งอยู่ในรูปสารละลาย ซึ่งจะมีผลทำให้เลือดถูกเจือจาง หากไม่ปรับด้วยค่า dilution factor จะทำให้จำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้ต่ำกว่าค่าที่แท้จริง



รูปที่ 9.10 platelet setellitosis ซึ่งเป็นลักษณะที่เกล็ดเลือดเกาะอยู่รอบ ๆ นิวโทรฟิล ซึ่งมีผลทำให้นับจำนวนเกล็ดเลือดได้ต่ำกว่าปกติ

[**ที่มา**: Maedel LB, Doig K. Examination of the peripheral blood smear and correlation with complete blood count. In: Rodak BF, Fritsma GA, Doig K, eds. Hematology. Clinical principles and applications. 3rd ed. St' Louis: Saunders Elsever, 2007; 176.]

8. จำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้จากเลือดที่เจาะจากปลายนิ้ว มีค่าต่ำกว่าเลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำ เนื่องจากมีการเกาะติดและเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดตรงบริเวณบาดแผลที่เจาะเลือด

9. ในการนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยใช้แอมโมเนียมออกซาเลตเข้มข้น 1% เป็นน้ำยาเจือจาง ควรใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์ แต่ถ้าไม่มีกล้องจุลทรรศน์ชนิดนี้ ก็อาจใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดาแทนได้ แต่ต้องปรับแสงให้เหมาะสม ไม่สว่างเกินไป และนับด้วยความระมัดระวัง

10. ในการนับเกล็ดเลือดโดยวิธี Rees-Ecker ควรจะเห็นเม็ดเลือดแดงด้วย ถ้าพบว่าเม็ดเลือดแดงแตก แสดงว่าน้ำยาเจือจางเสื่อมคุณภาพ ต้องเตรียมน้ำยาใหม่

บรรณานุกรม

1. นันทรัตน์ โฆมานะสิน, สุทธิพรรณ กิจเจริญ. การนับจำนวนเกล็ดเลือด. ใน: นันทรัตน์ โฆมานะสิน, นพมาศ เข็มทองหลาง, มณเฑียร พันธุเมธากุล, สุทธิพรรณ กิจเจริญ, บรรณาธิการ. การทดสอบพื้นฐานทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานา, 2547: 57-62.
2. Addison LA, Fischer PM. The office laboratory. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1990: 183-9.
3. Brown BA. Hematology : principles and procedures. 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993: 116-9.
3. Dacie JV, Lewis SM. Practical Haematology. 8th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995; 64.
4. Estridge BH, Reynolds AP. Basic clinical laboratory techniques. 5th ed. New York: Thomson Delmar Learning, 2008: 223-31.
5. Fimls AS. Hematology, a combined theoretical & technical approach. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989 : 227-8.
6. Glatzel JW, Gwattney-Krause S. Routine hematology methods. In : Harmening DM, ed. Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. 2nd ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1992; 523-53.
7. Hall R, Malia RG. Medical laboratory hematology. 2nd ed. Butterworth: Helnemann, 1991: 94-6.
8. Hippel TG. Routine testing in hematology. In: Rodak BF, Fritsma GA, Doig K, eds. Hematology.Clinical principles and applications. 3rd ed. St' Louis: Saunders Elsever, 2007; 160-74.
9. Maedel LB, Doig K. Examination of the peripheral blood smear and correlation with complete blood count. In: Rodak BF, Fritsma GA, Doig K, eds. Hematology. Clinical principles and applications. 3rd ed. St' Louis: Saunders Elsever, 2007; 175-92.
10. Ross DW. Laboratory evaluation of the patient with hematologic disease . In: Bick RL, ed. Hematology: clinical and laboratory practice. vol 1. St. Louis: Mosby, 1993; 7-16.

10. การนับจำนวนอีโอซิโนฟิล

Eosinophil Count

นันทรัตน์ โฆมานะสิน

ในปัจจุบันการนับจำนวนอีโอซิโนฟิลด้วยวิธีแมนวลมีการทำกันน้อยมาก เนื่องจากมีการใช้เครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติอย่างแพร่หลาย ซึ่งเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติชนิดนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวได้ 5 ชนิด (5-differential blood cell counter) สามารถนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิลและรายงานเป็นค่านับสัมบูรณ์ (absolute count) ได้ (ดูรายละเอียดในเรื่องเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ) สำหรับโรงพยาบาลที่ไม่มีเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ สามารถนับจำนวนอีโอซิโนฟิลได้ 2 วิธี คือ การนับโดยวิธีอ้อม (indirect count) และนับโดยวิธีตรง (direct count) การนับโดยวิธีอ้อมนั้นเป็นการคำนวณจากค่าการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวและการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว ค่าที่ได้จะไม่แม่นยำเท่ากับการนับโดยวิธีตรง ซึ่งทำโดยการเจือจางเลือดในน้ำยาเจือจางที่เหมาะสม แล้วนับจำนวนโดยใช้แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด ประโยชน์ของการนับจำนวนอีโอซิโนฟิล คือ สามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตอบสนองของอีโอซิโนฟิล แล้วมีผลทำให้มีความผิดปกติของจำนวนอีโอซิโนฟิล และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงหน้าที่ของต่อมหมวกไตส่วนนอก (adrenal cortex) ได้ โดยการนับจำนวนอีโอซิโนฟิลก่อนและหลังการให้ฮอร์โมนอะดรีโนคอร์ทิโคโทรปิก (adrenocorticotropic hormone; ACTH) ซึ่งเรียกว่า Thorn test

การนับโดยวิธีตรง

หลักการ

น้ำยาเจือจางซึ่งมีคุณสมบัติเป็นไฮโปโทนิก (hypotonic diluting reagent) จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และสีอีโอซิน (eosin) ในน้ำยาซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรด จะย้อมแกรนูลของอีโอซิโนฟิลเป็นสีแดง ในขณะที่เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นจะย้อมไม่ติดสีอีโอซิน

อุปกรณ์

1. ปิเปตต์สำหรับนับเม็ดเลือดขาว
2. แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด พร้อมด้วยกระจกปิดทับมาตรฐาน
3. อุปกรณ์สำหรับดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็ก
4. จานเพาะเชื้อสำหรับทำ moist chamber
5. เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด
6. กล้องจุลทรรศน์

น้ำยา

น้ำยาเจือจางที่ใช้สำหรับนับจำนวนอีโอซิโนฟิลมีอยู่หลายชนิดเช่น Phyloxine diluting fluid, Pilot's solution, Randolph's stain และ Dunger's diluting fluid เป็นต้น ในที่นี้จะขอกล่าวถึงรายละเอียดของ Dunger's diluting fluid ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

- acetone 10 มล.
- aqueous eosin (200 ก./ล.) 10 มล.
- น้ำกลั่น 80 มล.

น้ำยานี้หากเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บได้นาน 1 เดือน

สิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจสำหรับนับจำนวนอีโอซิโนฟิล ได้แก่ เลือดที่ใช้อีดีทีเอ หรือเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็ง หรืออาจเป็นเลือดที่เจาะจากปลายนิ้วหรือส้นเท้าก็ได้ นอกจากนี้ยังมีการนับจำนวนอีโอซิโนฟิลในน้ำเจาะไขสันหลัง (cerebrospinal fluid; CSF)

วิธีทำ

1. ใช้ปิเปตต์สำหรับนับเม็ดเลือดขาวดูดเลือดถึงขีด 1 พอดี แล้วเช็ดรอบนอกของปิเปตต์ให้สะอาดด้วยผ้าก๊อซหรือกระดาษซับที่สะอาด
2. ดูดน้ำยาเจือจางจนถึงขีด 11 พอดี
3. ถอดอุปกรณ์สำหรับดูดออก แล้วผสมเลือดและน้ำยาให้เข้ากันเป็นเวลานาน 2-3 นาที
4. ปล่อยสารละลายที่ผสมเข้ากันแล้วทิ้งประมาณ 1-2 หยด ซึ่งเป็นส่วนของน้ำยาที่อยู่ในส่วนของก้านปิเปตต์และไม่มีเลือดผสมอยู่
5. หยดสารละลายส่วนที่อยู่ในกระเปาะลงตรงร่องของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่ปิดด้วยกระจกปิดทับมาตรฐานไว้เรียบร้อยแล้ว ทั้ง 2 ข้าง
6. วางแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่หยดสารละลายแล้วไว้ใน moist chamber นาน 15 นาที
7. นับจำนวนอีโอซิโนฟิลที่มีแกรนูลติดสีแดง โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยาย 10X และนับทั้ง 9 ช่องใหญ่ (รูปที่ 1.2 หน้า....) บนทั้ง 2 ข้างของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด
8. คำนวณจำนวนอีโอซิโนฟิล ต่อลิตร ดังนี้

$$\text{จำนวนอีโอซิโนฟิล/ล.} = \frac{N \times \text{dilution factor} \times 10^6}{\text{ปริมาตรที่ใช้นับ (ไมโครลิตร)}}$$

N = จำนวนอีโอซิโนฟิลที่นับได้ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ข้างของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

ปริมาตรที่ใช้นับ = พื้นที่ x ความลึก x จำนวนช่องที่นับ

= (1x1) x 0.1 x 9

= 0.9 ลบ. มม.

หรือ = 0.9 ไมโครลิตร

dilution factor คำนวณได้ดังนี้

ในการเจือจางเลือด ดูดเลือดถึงขีด 1 แล้วดูดน้ำยาเจือจางถึงขีด 11 ซึ่งมีส่วนที่เป็นเลือดผสมกับน้ำยาเพียง 10 ส่วนในกระเปาะของปิเปตต์ อีก 1 ส่วนที่ก้านของปิเปตต์เป็นส่วนที่มีเฉพาะน้ำยาซึ่งเป็นส่วนที่ปล่อยทิ้งดังนั้นเลือดจึงถูกเจือจางไป 1:10 นั่นแสดงว่า dilution factor (ส่วนกลับของ dilution) = 10

ดังนั้น จำนวนอีโอซิโนฟิล/ล. = $\frac{N \times 10 \times 10^6}{0.9}$ /ล.

ค่าปกติ

0.05-0.35x10^9/ล. (50-350/ไมโครลิตร)

(ที่มา Brown BA. Hematology: principles and procedures. 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993: 119)

การแปลผล

1. จำนวนอีโอซิโนฟิล มีความสัมพันธ์ผกผัน (inverse relation) กับแอ็กติวิตี (activity) ของต่อมหมวกไตส่วนนอก (adrenal cortical) กล่าวคือ จำนวนอีโอซิโนฟิลจะต่ำใน Cushing's syndrome ซึ่งเป็นภาวะที่ต่อมหมวกไตส่วนนอกทำหน้าที่มากผิดปกติ และค่อนข้างสูงหรือสูงกว่าปกติใน Addison's disease (adrenal cortical insufficiency) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบที่เรียกว่า Thorn test ซึ่งเป็นการทดสอบที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงหน้าที่ของต่อมหมวกไตส่วนนอก โดยการนับจำนวนอีโอซิโนฟิลก่อนฉีด ACTH และนับอีกครั้งหลังจากฉีด ACTH ไปแล้ว 4 ชั่วโมง ในคนปกติพบว่าจำนวนอีโอซิโนฟิลหลังฉีด ACTH ลดลงประมาณมากกว่า 50% แต่ในผู้ป่วย Addison's disease ซึ่งต่อมหมวกไตส่วนนอกทำหน้าที่ได้น้อยกว่าปกติ จำนวนอีโอซิโนฟิลก่อนและหลังฉีด ACTH จะใกล้เคียงกันหรือจำนวนอีโอซิโนฟิลหลังฉีด ACTH ลดลงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50%

2. จำนวนอีโอซิโนฟิลสูงกว่าปกติในภาวะหรือโรคต่าง ๆ ดังนี้

2.1 parasitic infestations (nematodes; hookworm, ascaris, filaria, cysticer cosis, toxoplasma, etc.)

2.2 allergic disorders (asthma, hay fever, urticaria, etc.)

2.3 arthropod infection (scabies)

2.4 skin disease (psoriasis, ecze ma, etc.)

2.5 Hodgkin's disease

หมายเหตุ

1. ในขั้นตอนการย้อมสีแกรนูลของอีโอซิโนฟิลเป็นเวลา 15 นาที อาจไม่จำเป็นต้องใช้ moist chamber โดยหลังจากผสมเลือดและน้ำยาเจือจางในปิเปตต์แล้ว วางปิเปตต์ที่มีส่วนผสมของเลือดและน้ำยาเจือจางในแนวนอนเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา ผสมเลือดและน้ำยาเจือจางในปิเปตต์ก่อน

หยดส่วนผสมทิ้ง 1-2 หยด แล้วหยดส่วนผสมในกระเปาะลงบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่ปิดด้วยกระจกปิดทับมาตรฐานแล้ว ซึ่งวิธีทำทั้ง 2 วิธีนี้จะให้ผลการนับจำนวนอีโอซิโนฟิลไม่แตกต่างกัน

2. จำนวนอีโอซิโนฟิลของคนปกติจะมี diurnal variation นั่นก็คือค่าจะต่ำในตอนเช้าและสูงในตอนกลางคืน

3. การนับจำนวนอีโอซิโนฟิล โดยวิธีที่กล่าวมานี้มีความผิดพลาดประมาณ $\pm$ 30%

4. เพื่อเพิ่มความแม่นยำของการนับจำนวนอีโอซิโนฟิลโดยวิธีตรง ควรนับอีโอซิโนฟิลอย่างน้อย 100 เซลล์ % CV จะมีค่าประมาณ 10% ซึ่งอาจทำได้โดยการเพิ่มจำนวนครั้งของการนับ หรือใช้แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่มีปริมาตรมากขึ้น ได้แก่ Fuchs-Rosenthal counting chamber และ Spiers-Levy hemocytometer Fuchs-Rosenthal counting chamber มีปริมาตรของบริเวณที่ใช้นับเท่ากับ 3.2 ไมโครลิตร (4x 4 x 0.2 มม; กว้าง x ยาว x ลึก) สำหรับ Spiers-Levy hemocytometer มีปริมาตรของบริเวณที่ใช้นับเท่ากับ 2.0 ไมโครลิตร (2 x 5 x 0.2 มม; กว้าง x ยาว x ลึก) สำหรับการนับจำนวนอีโอซิโนฟิลโดยวิธีอ้อมจะมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้นถ้าทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวจำนวน 500 เซลล์

5. การนับจำนวนอีโอซิโนฟิลในสิ่งส่งตรวจแต่ละรายควรทำให้เสร็จภายในเวลา 30 นาที ไม่เช่นนั้นอีโอซิโนฟิลจะแตกสลาย

การนับโดยวิธีอ้อม

เป็นการคำนวณจำนวนอีโอซิโนฟิลสัมบูรณ์จากค่าจำนวนเม็ดเลือดขาว และเปอร์เซ็นต์ของอีโอซิโนฟิล จากการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวจากสูตรต่อไปนี้

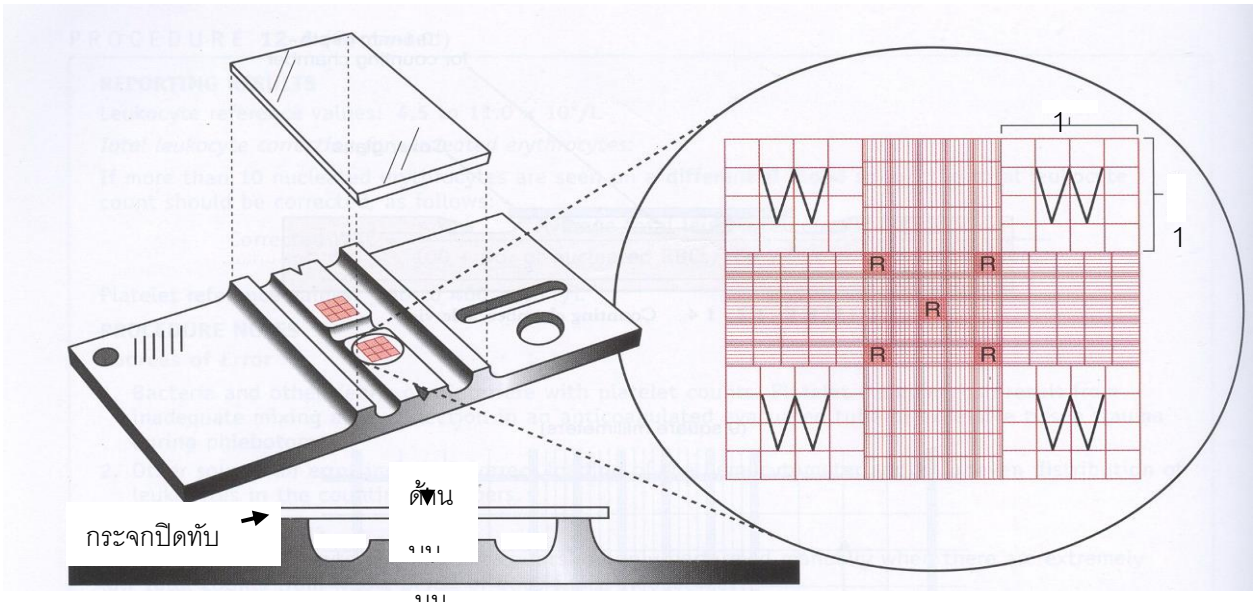
$$\text{จำนวนอีโอซิโนฟิล/ล.} = \frac{\text{เปอร์เซ็นต์ของอีโอซิโนฟิล} \times \text{จำนวนเม็ดเลือดขาว/ล.}}{100}$$

ซึ่งผลที่ได้ไม่แม่นยำเท่ากับการนับโดยวิธีตรง แต่สามารถเพิ่มความแม่นยำได้โดยการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวจำนวน 500 เซลล์ โดยทั่วไปแล้วจะใช้วิธีนี้เพื่อตรวจสอบผลจากการนับโดยวิธีตรง ผลการนับจากทั้งสองวิธีควรสอดคล้องกัน หากมีความแตกต่างกันมาก ควรนับซ้ำ

บรรณานุกรม

1. Brown BA. Hematology : principles and procedures. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993: 119-21.
2. Chanarin I. Laboratory haematology. An account of laboratory techniques. New York: Churchill Livingstone, 1989: 12-3.
3. Hall R, Malia RC. Medical Laboratory haematology. London: Butterworth, 1984: 104-5.

4. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Dacie and Lewis practical haematology. 10th ed. Philadelphia: Elsevier Ltd., 2006.
5. Seivierel CE. Hematology for medical technologists. Philadelphia: Lea & Febiger, 1972: 494-9.



รูปที่ 1.2 แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด (hemocytometer) หรือ counting chamber ด้านบนและด้านข้าง และตารางบนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

ที่มา: Turgeon ML. Clinical laboratory science: the basic and routine techniques. 5th ed. St.Louis: Mosby,2007: 272)