ปฏิบัติการสรีรวิทยาของสัตว์
เรื่อง การตรวจทางโลหิตวิทยาของสัตว์ (Animal Hematology Procedures)

โดย อาจารย์วิน เชยชมศรี
ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<u>บทนำ</u>

เลือด (Blood) มีลักษณะเป็นของเหลวไหลเวียนในหลอดเลือด แบบระบบปิด ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วนใหญ่ คือ

1. น้ำเลือด (Blood plasma or serum) เป็นส่วนที่เป็นของเหลวมีประมาณ 55% ของเลือด

พลาสมา (plasma) หมายถึง น้ำเลือดที่แยกเอาเซลล์เม็ดเลือดออกไปแล้ว ประกอบด้วย โปรตีนชนิดต่างๆ รวมถึงปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน ฮอร์โมน และเกลือแร่ต่างๆ การจะแยกเพื่อให้ได้เป็นพลาสมา ต้องเก็บเลือดโดยใช้สารกันเลือดแข็ง (anticoagulants) เช่น EDTA (ethylene diaminetetraacetate), heparin, ACD (Acid citrate dixtrose) เป็นต้น

ซีรั่ม (serum) หมายถึง เลือดที่แยกเอาเซลล์เม็ดเลือดออกไปภายหลังจากเลือดแข็งตัวแล้วในซีรั่มจะต่างจากพลาสมาคือไม่มี fibrinogen เนื่องจากถูกใช้ไปในการแข็งตัวของเลือด

2. เซลล์เม็ดเลือด (Blood corpuscles) แขวนลอยไหลเวียนในหลอดเลือดทั่วร่างกาย มีประมาณ 45% เซลล์เม็ดเลือด แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

2.1 <u>เม็ดเลือดแดง</u> (Erythrocyte or Red blood cell) ทำหน้าที่ขนถ่ายออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างปอดและเนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย มีรูปร่างกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7.5 μm ตรงกลางเว้าเข้าหากันทั้งสองด้าน (biconcave) ลักษณะเป็นถุงห่อหุ้มสารละลายต่างๆ ไว้ภายในซึ่งส่วนใหญ่ คือ ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เอนไซม์ และพวกอิออนต่างๆ

2.2 <u>เม็ดเลือดขาว</u> (Leukocyte or White blood cell) มีหน้าที่หลัก คือป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดมีหลาย ชนิด แบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ

1) เม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล หรือ มีนิวเคลียสหลายแบบ (Granulocyte or poly- morphonuclear cell) มีขนาดประมาณ 9-15 μm แบ่งย่อยออกตามลักษณะการติดสีของแกรนูล เมื่อย้อมด้วยลีไร้ท (Wright's stain) ดังนี้

ก. Neutrophil or polymorphonuclear cell (PMN) มีนิวเคลียสได้ตั้งแต่ 2-5 lobe ในไซโทพลาซึมมีแกรนูลละเอียดมาก ติดสีชมพูหรือชมพูม่วง

ข. Eosinophil ส่วนใหญ่นิวเคลียสจะมี 2 lobe ในไซโทพลาซึมมีแกรนูลเม็ดใหญ่ ติดสีส้มแดง ค่อนข้างวาวแสงอยู่เต็มไซโทพลาซึม และมักไม่ทับนิวเคลียส

ค. Basophil นิวเคลียสมีตั้งแต่ 2-5 lobe แต่มักจะเห็นนิวเคลียสไม่ชัดเพราะถูกบังด้วยแกรนูลซึ่งมีขนาดใหญ่ติดสีน้ำเงินเข้มกระจายทั่วไซโทพลาซึม

2) เม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีแกรนูล หรือ มีนิวเคลียสเดียว (Agranulocyte or mono- nuclear cell) เป็นเม็ดเลือดขาวที่ไม่มีแกรนูลเฉพาะ (Specific granule) แบ่งย่อยได้ 2 ชนิด คือ

ก. Monocyte เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในกระแสเลือด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 15-25 μm.) นิวเคลียสมักจะเว้า ไซโทพลาซึมมากติดสีเทาอ่อนๆ หรือน้ำเงินปนเทาและมีแกรนูลไม่เฉพาะเป็นเม็ดเล็กๆ ติดสีแดงกระจายอยู่ทั่วไป

ข. Lymphocyte โดยทั่วไปเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดเล็กที่สุด (ใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงเล็กน้อย) ขนาดประมาณ 10 ไมครอน แต่บางครั้งอาจพบมีขนาดใหญ่ได้ (20 μm) นิวเคลียสมักจะกลมหรือรี และอาจมีรอยเว้าได้บ้าง ติดสีเข้มทึบ อยู่ชิดริมด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ไซโตพลาสซึม ติดสีฟ้าอ่อน ใส และพบแกรนูลไม่เฉพาะได้บ้าง

3. <u>เกล็ดเลือด</u> (Thrombocyte or platelet) ในคนหรือในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนที่หลุดมาจากไซโทพลาซึมของ Megakaryocyte มีขนาดเล็กมาก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 μm ไม่มีนิวเคลียส มีรูปร่างกลมแบนหรือรูปไข่ ไซโทพลาซึมติดสีฟ้าอ่อน มีแกรนูลไม่เฉพาะกระจายอยู่ทั่วไปกลางเซลล์ ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด

ปริมาณและหน้าที่ของเซลล์ตลอดจนสารต่างๆ ในเลือดเป็นปัจจัยที่สำคัญควบคุมให้การทำงานของร่างกายดำเนินไปได้อย่างปกติ การทดสอบทางโลหิตวิทยาสามารถจะแสดงให้ทราบสภาวะ หรือพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับร่างกายได้เช่น เมื่อร่างกายมีภาวะโรคติดเชื้อเกิดขึ้น จำนวนของเม็ดเลือดขาวในร่างกายจะเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ ในคนที่เป็นโรคโลหิตจางค่าของจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าของฮีโมโกลบิน ค่าของฮีมาโตคริต จะมีค่าลดลงกว่าค่าปกติที่พบในบุคคลที่มีร่างกายแข็งแรงในคนไข้ที่เป็นโรคฮีโมฟิเลีย (Hemophilia) ซึ่งเป็นโรคที่มีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดสามารถพบความผิดปกติของเกล็ดเลือด และการทดสอบเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด ฯลฯ เป็นต้น

การตรวจทางโลหิตวิทยาในปฏิบัติการนี้ ได้แก่

1. Complete Blood Count (CBC) ประกอบด้วย
   1.1 การหาค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin Determination)
   1.2 การหาปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Pack Cell Volume or Hematocrit)

1.3 การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (White Blood Cell Count)

1.4 การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Differential White Cell Count)

2. การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell Count)

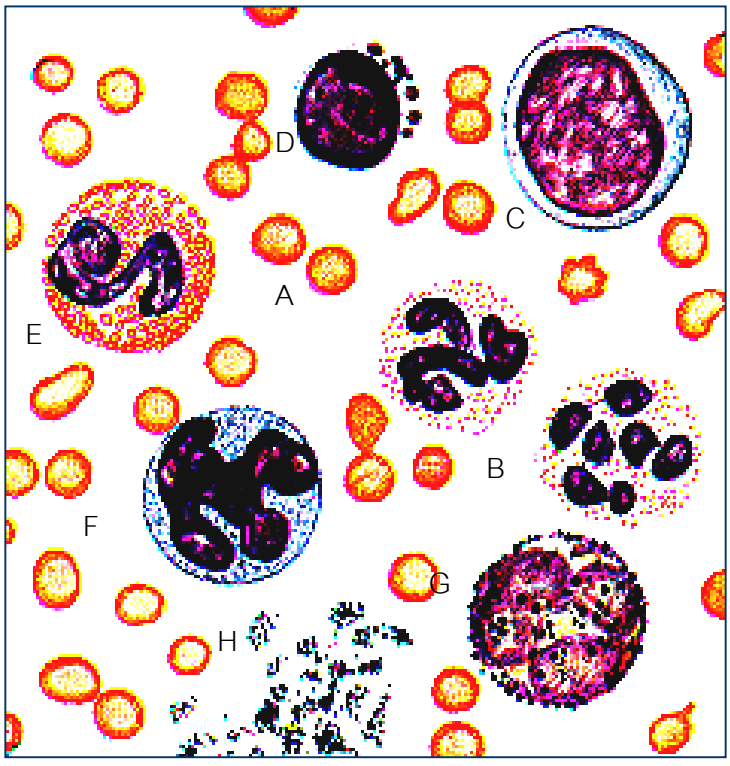
<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อให้นิสิตทราบถึงองค์ประกอบตลอดจนหน้าที่ และความสำคัญของระบบเลือดในสัตว์ชนิดต่างๆ

2. นิสิตสามารถบอกถึงวิธีการตรวจสอบทางโลหิตวิทยาชนิดต่างๆ พร้อมทั้งอธิบายหลัก การตรวจอย่างคร่าวๆ ได้

3. เพื่อให้นิสิตสามารถทดสอบหาค่าทางโลหิตวิทยาและบอกความแตกต่างของคุณสมบัติเลือดในสัตว์ชนิดต่างๆ

4. นิสิตจะได้รู้ถึงประโยชน์ที่สำคัญในการตรวจทางโลหิตวิทยา และการแปลผล



ภาพที่ 1 เซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ที่พบในสเมียร์เลือดของคนปกติ

A – Red Blood Cell (Erythrocyte) B – Neutrophil

C – (Large) Lymphocyte D - (Small) Lymphocyte

E – Eosinophil F – Monocyte G – Basophil

H – Platelet (Thrombocyte)

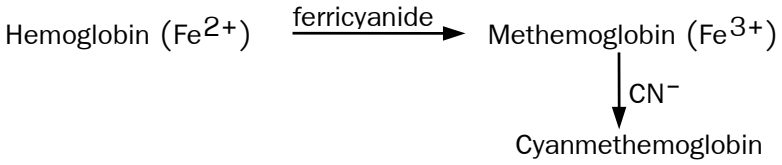
การหาค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin Determination)

ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เป็นส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดงความเข้มข้นของฮีโมโกลบินคิดเป็นกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (g/100 ml หรือ g%) หรือกรัมต่อ 1 เดซิลิตร (g/dl) การหาค่าของฮีโมโกลบินทำได้หลายวิธีที่นิยมคือวิธีเทียบสี (Colorimetric method) โดยมีการเปลี่ยนฮีโมโกลบินให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ (derivative) ก่อน เช่น acid hematin, alkaline hematin หรือ cyanmethemoglobin และเทียบสีของ unknown sample กับ standard

ในปฏิบัติการนี้จะหาค่าฮีโมโกลบิน โดย cyamethemoglobin method ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการให้ค่าความแม่นยำสูงและวัดฮีโมโกลบินได้ทุกรูปแบบยกเว้น sulfhemoglobin

<u>หลักการ</u>

เมื่อผสมเลือดกับน้ำยา Drabkin's ซึ่งมี ferricyanide และ cyanide อยู่ด้วย fericyanide จะออกซิไดส์เหล็ก (Fe^{2+}) ในฮีโมโกลบินให้เปลี่ยนเป็น methemoglobin (Fe^{3+}) ซึ่งจะรวมกับ cyanide เป็น Cyanmethemoglobin วัดสี cyanmethemoglobin ที่เกิดขึ้น



<u>อุปกรณ์</u>

- อุปกรณ์เจาะเลือดจากผิวหนังหรือจากหลอดเลือดดำ
  - ใบมีดเจาะเลือด (Blood lancet) หรือเข็มเจาะเลือด (Syringe)
  - 70% แอลกอฮอล์
  - สำลีแห้ง
- Sahli pipette (Hemoglobin pipette) หรือไมโครไปเปต (Micropipette)
- Mouth piece with sucking tube หรือ Tip สำหรับไมโครไปเปต
- หลอดทดลอง
- Spectrophotometer
- น้ำยา Drabkin's solution (Cyanmethemoglobin reagent)

<u>วิธีทำ</u>

1. ใส่น้ำยา Drabkin's ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ 5 ml.
2. ดูดเลือดที่เจาะจากผิวหนังหรือจากหลอดเลือดดำ 20 µl. โดยใช้ sahli pipette เช็ดข้างๆ pipette ให้สะอาด หรือใช้ micropipette
3. ปล่อยเลือดลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยา Drabkin's อยู่ แล้วดูดน้ำยาขึ้นมาล้างเลือดที่ติดอยู่ด้านข้าง pipette 2-3 ครั้ง ผสมเลือดกับน้ำยาให้ทั่วกัน
4. ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 5 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (O.D.) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาว คลื่น 540 nm. โดยใช้น้ำยา Drabkin's เปล่าๆ เป็น blank กรณีที่เป็นสัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะต้องนำน้ำยา Drabkin's ที่มีเลือดปนอยู่ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงและเศษของเซลล์ ก่อนนำไปวัด O.D.
6. อ่านค่า g% ของฮีโมโกลบิน จากกราฟแสดง standard calibration curve หรือตารางซึ่งได้จากการวัดเทียบกับ standard hemoglobin ซึ่งได้เตรียมไว้ให้แล้ว

ค่าปกติ	Hemoglobin (g%)
คน	ชาย 15.3 $\pm$ 1.05
	หญิง 13.4 $\pm$ 0.95
สุนัข	15.0 (12-19)
แมว	12.0 (9-15)
โค	11.0 (8-15)
แกะ	11.5 (9-15)
แพะ	10.0 (8-12)
ม้า	14.4 (10-16)
สุกร	13.0 (10-16)

ตารางที่ 1 แสดงค่าปกติของ hemoglobin ของคนและสัตว์ต่างๆ (ธรรมศักดิ์, 2516; Hean,1995; Jain,1993)

การหาปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed Cell Volume or Hematocrit)

ฮีมาโตคริต (Hct) หรือปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) คือปริมาตรเม็ดเลือดแดงคิดเป็นร้อยละของปริมาตรเลือดทั้งหมด ปัจจุบันทำการหาค่าดังกล่าวโดยวิธี Microhematocrit

<u>หลักการ</u>

ปั่นเลือดด้วยอัตราเร็วและเวลาคงที่แล้ววัดปริมาตรเม็ดเลือดแดงที่อัดแน่นเทียบกับปริมาตรทั้งหมดของเลือด

<u>อุปกรณ์</u>

- อุปกรณ์เจาะเลือดจากผิวหนังหรือจากหลอดเลือดดำ
- Heparinized capillary tube (แถบคาดสีแดง)
- Microhematocrit centrifuge
- Microhematocrit reader
- ดินน้ำมัน

<u>วิธีทำ</u>

1. เจาะเลือดจากผิวหนังหรือจากหลอดเลือดดำว

2. ใช้ heparinzed capillary tube ดูดเลือดจากผิวหนังโดยเอียงเล็กน้อยเลือดจะถูกดูดโดย capillary attraction เข้าไปในหลอดเอง ดูดให้เลือดเข้าไป 2/3-3/4 ของความยาวหลอด หรือกรณีที่เป็นเลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำ ใช้ capillary tube ดูดเลือดจากหลอดเก็บเลือด

3. ปิดปลายข้างหนึ่งของ capillary tube ด้วยดินน้ำมัน ระวังอย่าให้ดินน้ำมันเอียงเพื่อไม่ให้เกิดความผิดพลาดในการอ่านค่า

4. ใส่ capillary tube ลงในเครื่องปั่น (microhematocrit centrifuge) โดยให้ปลายที่อุดดินน้ำมันไว้ชี้ไปด้านนอกของเครื่องปั่น (ก่อนที่จะปั่นต้องปรับความสมดุลย์ของเครื่องด้วย balance capillary tube) ปั่นด้วยอัตราเร็ว 11,500-15,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที

5. อ่านปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่อยู่ในหลอดซึ่งเป็นส่วนล่างสุด ส่วนที่อยู่ถัดขึ้นมาเป็นชั้นของเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดเรียกว่า “buffy coat” สังเกตเห็นเป็นชั้นบางๆ มีสีขาวปนเทา ส่วนบนสุดคือส่วนของพลาสมา มีสีเหลืองใส อ่านด้วยเครื่อง microhematocrit reader โดยไม่รวมส่วน buffy coat ถ้าไม่มีเครื่องอ่านค่าให้ใช้ไม้บรรทัดวัด

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{PCV (\%)} = \frac{\text{ความสูงของชั้นเม็ดเลือดแดง (มม.) x 100}}{\text{ความสูงของเลือดทั้งหมด (มม.)}}$$

ค่าปกติ	PCV or Hct (%)

คน	ชาย 46 ± 3.1
	หญิง 40 ± 2.7
สุนัข	45 (43-57)
แมว	37 (30-45)
โค	35 (24-46)
แกะ	35 (27-45)
แพะ	28 (22-38)
ม้า	41 (27-43)
สุกร	42 (32-50)

ตารางที่ 2 แสดงค่าปกติของปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของคนและสัตว์ต่างๆ (ธรรมศักดิ์, 2516; Hean,1995; Jain,1993)

การนับจำนวนเม็ดเลือด (Blood Cell Counting)

เนื่องจากสัตว์มีกระดูกสันหลังยกเว้นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลักษณะเม็ดเลือดแดงมีนิวเคลียส ดังนั้นการนับจำนวนเม็ดเลือด สามารถทำได้ใน chamber เดียวกัน โดยมีหลายเทคนิคขึ้นอยู่กับน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดที่เลือกใช้ เช่น Natt and Herrick's solution, Toluidine Blue, Modified Rees-Ecker solution ฯลฯ หรือ การใช้เทคนิค Becton Dickinson Eosinophil Unopette #5877 ซึ่งในปฏิบัติการนี้จะได้แยกการนับจำนวนเม็ดเลือดออกเป็นการนับจำนวนเม็ดเลือดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และการนับจำนวนเม็ดเลือดในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ

อุปกรณ์

1. Hemocytometer or Counting chamber

แบ่งเป็น 2 chamber ตารางบนแต่ละ chamber มีความกว้าง 3 มม. ยาว 3 มม. ในแต่ละ chamber แบ่งเป็น 9 ช่อง แต่ละช่องมีความกว้างและยาว 1 มม. และเมื่อปิด cover-chamber แล้วจะมีความลึก 0.1 มม. ดังนั้น แต่ละช่องจะมีปริมาตร 1x1x0.1 = 0.1 ลบ.มม.

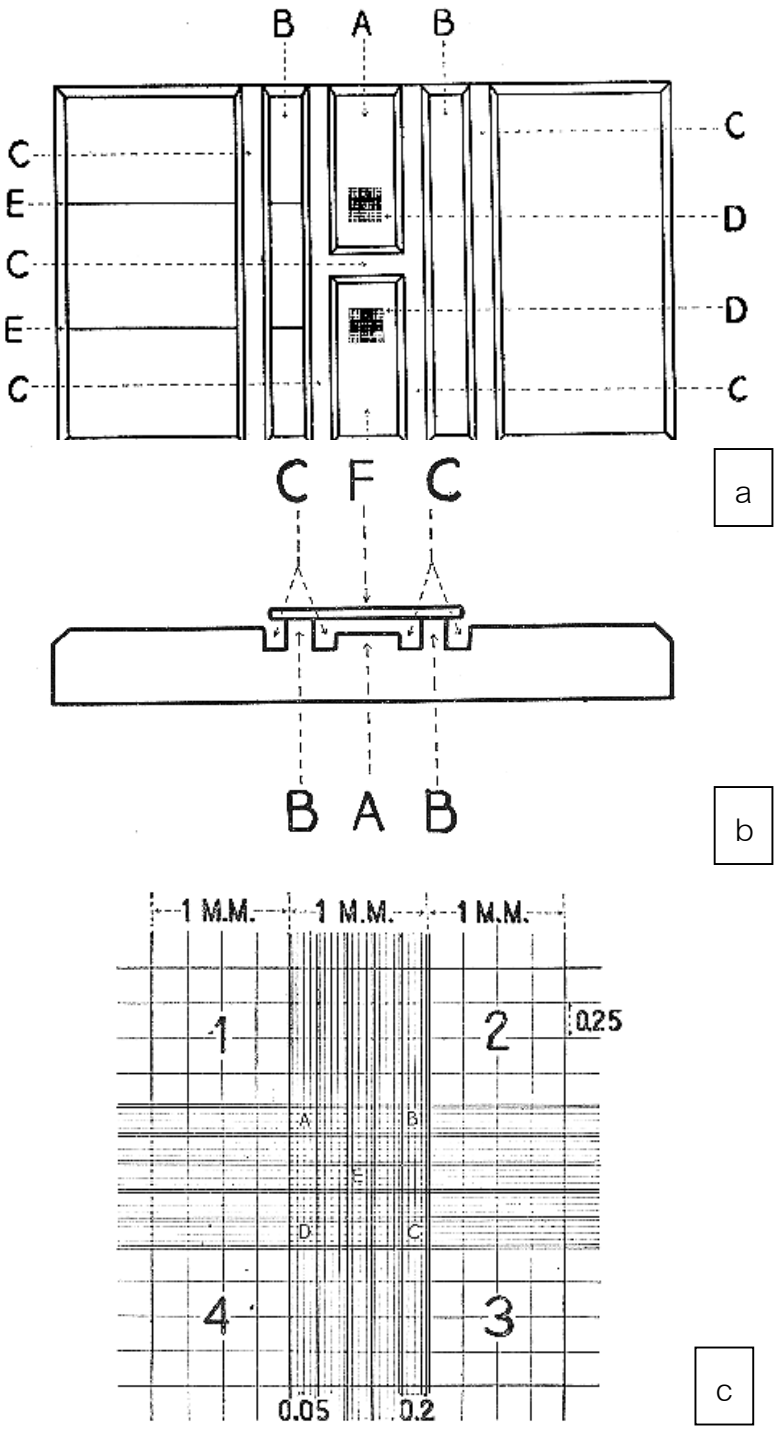
ที่ขอบของตารางจะเห็นมีเส้นอยู่ 3 เส้น ให้คือเส้นกลางเป็นเส้นขอบและในแต่ละช่องที่มุมทั้งสี่ แบ่งออกเป็นช่องเล็กๆ อีก 16 ช่อง ซึ่งใช้ในการนับเม็ดเลือดขาว ส่วนช่องตรงกลางแบ่งออกเป็น 25 ช่องเล็ก และจะใช้ช่องเล็กนี้เพียง 5 ช่อง คือ ช่องเล็กที่มุมทั้งสี่ และตรงกลางสำหรับนับเม็ดเลือดแดง ซึ่งในแต่ละช่องเล็กใน 25 ช่องนี้จะแบ่งเล็กลงไปอีกเป็น 16 ช่อง ดังรูปที่

2. Red cell pipette

ใช้สำหรับเจือจางเลือด เพื่อนำไปนับเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ลักษณะเป็น pipette มีกระเปาะค่อนไปริมข้างหนึ่งภายในกระเปาะมีเม็ดพลาสติกสีแดงอยู่ ที่ก้าน pipette จะแบ่งเป็นสเกล 0.0, 0.5 และ 101

3. White cell pipette

ใช้สำหรับเจือจางเลือดเพื่อนับเม็ดเลือดขาว ลักษณะรูปร่างคล้าย Red cell pipette แต่มีกระเปาะเล็กกว่า และแบ่งสเกล 0.0, 0.1 และ 11 เม็ดพลาสติกที่อยู่ในกระเปาะเป็นสีขาว



ภาพที่ 2 a: Hemocytometer (Counting chamber) ด้านบน b: Hemocytometer (Counting chamber) ด้านข้าง b: สเกลใน Hemocytometer (Counting chamber) ช่อง 1, 2, 3, 4 (4 ช่อง) คือ ช่องที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดขาว ช่อง A, B, C. D, E (5 ช่อง) คือ ช่องที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดแดง

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (White Blood Cell Count)

หลักการ

เจือจางเลือดให้มีจำนวนเม็ดเลือดขาวที่พอเหมาะ ในน้ำยาที่เป็น isotonic ต่อเม็ดเลือด และสามารถทำลายเม็ดเลือดแดงซึ่งมีอยู่ในเลือดเป็นจำนวนมากได้

อุปกรณ์

1. WBC pipette
2. Mouth piece with sucking tube
3. Hemocytometer (Counting chamber) with cover chamber
4. น้ำยา WBC diluting solution
5. กล้องจุลทรรศน์
6. อุปกรณ์เจาะเลือดจากผิวหนังหรือหลอดเลือดดำ

วิธีทำ

1. ดูดเลือดที่เจาะจากผิวหนังหรือหลอดเลือดดำเข้าไปใน WBC pipette ให้ถึงขีด 0.5 พอดี (ถ้าดูดเลือดเกินขีด 0.5 ขึ้นมาเล็กน้อย (ไม่เกิน 2 มม.) ให้ปรับมาอยู่ที่ขีด 0.5 โดยใช้ผ้าที่สะอาดแตะที่ปลาย pipette เพื่อซับเลือดส่วนเกิน ถ้าดูดเลือดเกินขีด 0.5 ขึ้นมามาก ให้เป่าเลือดออกแล้วรีบดูดน้ำสะอาด หรือ WBC diluting solution ให้ถึงขีด 11 แล้วจึงล้างให้สะอาดภายหลัง เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแห้งและอุดตัน pipette)

2. เช็ด pipette ด้านนอกให้สะอาด

3. ดูด WBC diluting solution ถึงขีด 11 ให้ pipette อยู่ในลักษณะเกือบเป็นแนวตั้งเพื่อป้องกันไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในกระเปาะของ WBC pipette

4. จับ pipette ให้อยู่ในแนวราบ ใช้นิ้วชี้ปิดปลาย pipette ไว้ แล้วถอด sucking tube ออก

5. จับ pipette โดยปิดปลายทั้งสองข้างด้วยนิ้วหัวแม่มือและนิ้วกลาง แล้วเขย่าในแนวนอน 2-3 นาที เพื่อผสมเลือดและ WBC diluting solution เข้าด้วยกัน

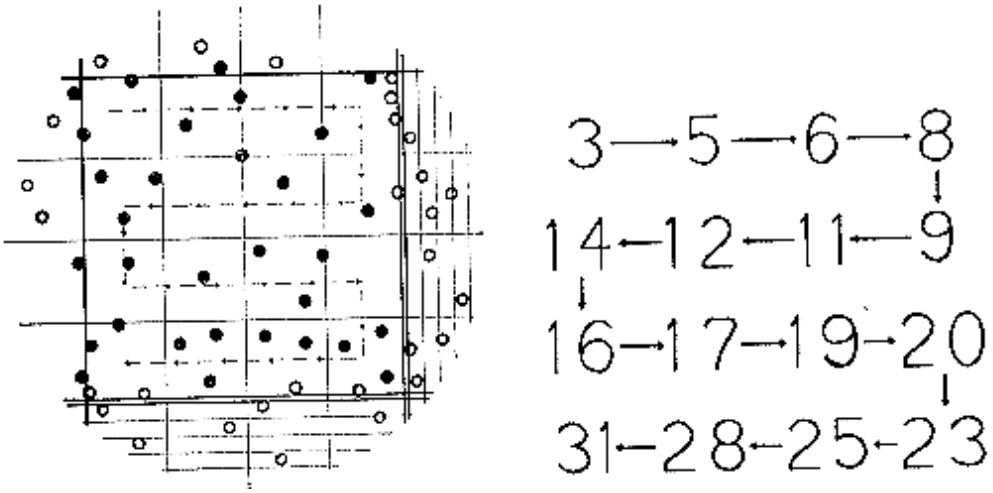
6. หยด solution จาก pipette 4-5 หยดแรกทิ้งไปเพราะ solution ส่วนนี้ไม่ได้ผสมกับเลือด เช็ดปลาย pipette ให้แห้งด้วยผ้าสะอาด

7. หยด solution หยดต่อไปลงตรงร่องของ counting chamber ที่ปิด cover chamber ไว้เรียบร้อยแล้ว โดยให้ปลาย pipette แตะตรงขอบของ cover chamber และ pipette ทำมุมกับ counting chamber ประมาณ 45 ใช้นิ้วชี้ปิดปลายด้านบนของ pipette ไว้ เพื่อควบคุมให้ solution จาก pipette ค่อยๆ ลงสู่ counting chamber จนเต็มพอดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดขาวหยุดนิ่ง ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้น หรือ solution หยดใหญ่เกินไปจนล้น

counting chamber ให้ใช้ผ้าที่สะอาดทำความสะอาด counting chamber แล้วจึงหยด solution ใหม่ (ต้องเขย่าให้เข้ากันดีก่อนจะหยดใหม่ทุกครั้ง)

8. นับจำนวนเม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 3) โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ (10x) ในช่อง W ที่มุมทั้งสี่ของ counting chamber นำจำนวนที่นับได้มารวมกัน แล้วคำนวณเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวต่อ 1 ลบ.มม.

9. เมื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาวเสร็จ ให้รีบทำความสะอาด counting chamber และ cover-glass ด้วยผ้าสะอาดและนุ่มทันที



ภาพที่ 3 วิธีการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวในบริเวณ ที่ 1

<u>การคำนวณ</u>

จำนวนเม็ดเลือดขาว/ลบ.มม. = $\frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ x dilution factor}}{\text{ปริมาตรที่ใช้นับ}}$

dilution factor = 20 (เพราะจากการเจือจางเลือดใช้เลือด 0.5 ส่วนแล้วดูด diluting solution จนถึงขีด 11 แต่เลือดผสมกับ diluting solution จริงในกระเปาะเพียง 10 ส่วน ดังนั้นเลือดจะถูกเจือจางไป 1:20)

ปริมาตรที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดขาว = พื้นที่ x ความลึก x จำนวนช่อง W ที่นับ

= (1 x 1) x 0.1 x 4 = 0.4 ลบ.มม.

จำนวนเม็ดเลือดขาว/ลบ.มม. = $\frac{N \times 20}{0.4}$

= N x 50

N คือ จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้ง 4 ช่อง W

ค่าปกติ	WBC (cells/mm^3)
คน	5000-10000
สุนัข	6000-17000
แมว	5500-19500
โค	4000-12000
แกะ	4000-12000
แพะ	4000-13000
ม้า	5500-14300
สุกร	1100-22000

ตารางที่ 3 แสดงค่าปกติของปริมาณเม็ดเลือดขาวของคนและสัตว์ต่างๆ (ธรรมศักดิ์, 2516; Hean,1995; Jain,1993)

การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (Red blood cell count)

หลักการ

เจือจางเลือดให้มีเม็ดเลือดแดงพอเหมาะที่จะนับได้สะดวก ด้วยน้ำยาที่เป็น isotonic ต่อเม็ดเลือดแดง

อุปกรณ์

- RBC pipette
- Mount piece with sucking tube
- Counting chamber with cover chamber
- น้ำยา RBC diluting solution
- กล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์เจาะเลือดจากผิวหนังหรือหลอดเลือดดำ

วิธีทำ

1. ดูดเลือดที่เจาะจากผิวหนังหรือหลอดเลือดดำเข้าไปใน RBC pipette ให้ถึงขีด 0.5 พอดี (ถ้าดูดเลือดเกินขีด 0.5 ขึ้นมาเล็กน้อย (ไม่เกิน 2 มม.) ให้ปรับมาอยู่ที่ขีด 0.5 โดยใช้ผ้าที่สะอาดแตะที่ปลาย pipette เพื่อซับเลือดส่วนเกิน ถ้าดูดเลือดเกินขีด 0.5 ขึ้นมามาก ให้เป่าเลือดออกแล้วรีบดูดน้ำสะอาด หรือ RBC diluting solution ให้ถึงขีด 101 แล้วจึงล้างให้สะอาดภายหลัง เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแห้งและอุดตัน pipette)

2. เช็ด pipette ด้านนอกให้สะอาด

3. ดูด RBC diluting solution ถึงขีด 101 ให้ pipette อยู่ในลักษณะเกือบเป็นแนวตั้งเพื่อป้องกันไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในกระเปาะของ WBC pipette

4. จับ pipette ให้อยู่ในแนวราบ ใช้นิ้วชี้ปิดปลาย pipette ไว้ แล้วถอด sucking tube ออก

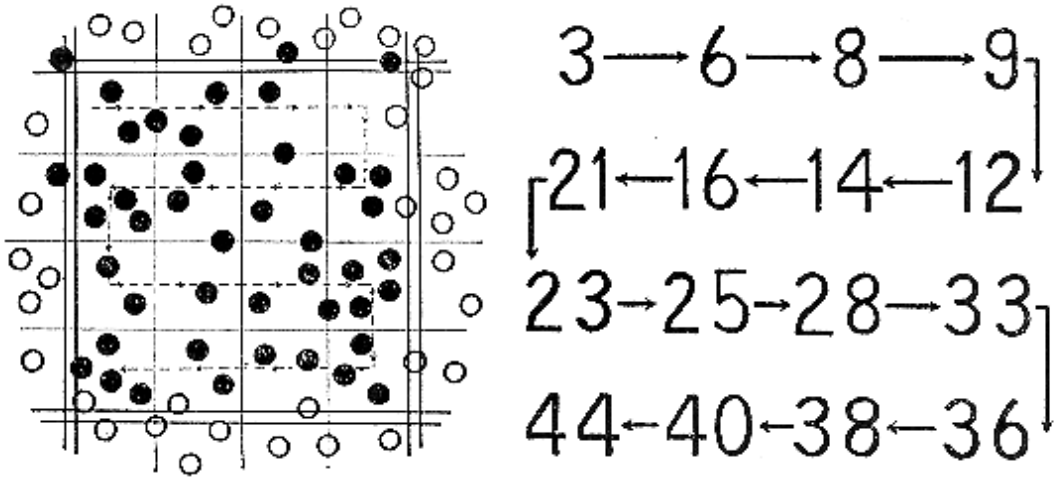
5. จับ pipette โดยปิดปลายทั้งสองข้างด้วยนิ้วหัวแม่มือและนิ้วกลาง แล้วเขย่าในแนวนอน 2-3 นาที เพื่อผสมเลือดและ RBC diluting solution เข้าด้วยกัน

6. หยด solution จาก pipette 4-5 หยดแรกทิ้งไปเพราะ solution ส่วนนี้ไม่ได้ผสมกับเลือด เช็ดปลาย pipette ให้แห้งด้วยผ้าสะอาด

7. หยด solution หยดต่อไปลงตรงร่องของ counting chamber ที่ปิด cover chamber ไว้เรียบร้อยแล้ว โดยให้ปลาย pipette แตะตรงขอบของ cover chamber และ pipette ทำมุมกับ counting chamber ประมาณ 45 ใช้นิ้วชี้ปิดปลายด้านบนของ pipette ไว้ เพื่อควบคุมให้ solution จาก pipette ค่อยๆ ลงสู่ counting chamber จนเต็มพอดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดขาวหยุดนิ่ง ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้น หรือ solution หยดใหญ่เกินไปจนล้น counting chamber ให้ใช้ผ้าที่สะอาดทำความสะอาด counting chamber แล้วจึงหยด solution ใหม่ (ต้องเขย่าให้เข้ากันดีก่อนจะหยดใหม่ทุกครั้ง)

8. นับจำนวนเม็ดเลือดแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ (10x) เพื่อหาช่องตรงกลางก่อน แล้วจึงเปลี่ยนเป็นเลนส์วัตถุกำลังขยายสูง (40X) นับจำนวนเม็ดเลือดแดงในช่อง R นับจนครบ 5 ช่อง R (ใน 1 ช่อง R จะมีช่องเล็กๆ 16 ช่อง) แล้วนำมารวมกันเพื่อใช้คำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ลบ.มม.

9. เมื่อนับจำนวนเม็ดเลือดแดงเสร็จแล้วให้รีบทำความสะอาด counting chamber และ cover chamber ด้วยผ้านุ่มสะอาดทันที



ภาพที่ 4 วิธีการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงในบริเวณ ที่ A

การคำนวณ

จำนวนเม็ดเลือดแดง/ลบ.มม. = จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ x dilution factor
ปริมาตรที่ใช้นับ

dilution factor คือ 200 (ในการเจือจางเลือดใช้เลือด 0.5 ส่วนแล้วดูด diluting solution ถึงขีด 101 แต่น้ำยา 1 ส่วนที่อยู่ตรงก้าน pipette ไม่ได้ผสมกับเลือด ดังนั้นเลือดดูดเจือจางใน 1:200)

ปริมาตรที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดแดง = พื้นที่ x ความลึก x จำนวนช่อง R

= (0.2 x 0.2) x 0.1 x 5

= 0.02 ลบ.มม.

จำนวนเม็ดเลือดแดง/ลบ.มม. = N x 200

0.02

= N x 10,000

N คือ จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ทั้งหมดใน 5 ช่อง R

ค่าปกติ	RBC (10^6 cells/mm^3)
คน	ผู้ชาย 5.40 $\pm$ 0.53
	ผู้หญิง 4.76 $\pm$ 0.39
สุนัข	6.8
แมว	7.5
โค	7.0
แกะ	12.0
แพะ	13.0
ม้า	9.0
สุกร	6.5

ตารางที่ 4 แสดงค่าปกติของปริมาณเม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ต่างๆ (ธรรมศักดิ์, 2516; Hean,1995; Jain,1993)

7

การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Differential While Cell Count)

หลักการ

นำเลือดมาสเมียร์ (smear) แล้วทำการย้อมสี ทำการตรวจสเมียร์เลือด (blood smear) ในบริเวณที่เม็ดเลือดแดงกระจายตัวดี โดยการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวออกเป็นเปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์

- กระจกแก้ว (slide)
- Absolute methanol
- สีไรท์:- Dip Quick
- กล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์เจาะเลือดจากปลายนิ้ว

วิธีทำ

1. หยดเลือดหยดเล็กๆ (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 mm.) ห่างจากปลาย slide ข้างหน้า ประมาณ 1 นิ้ว

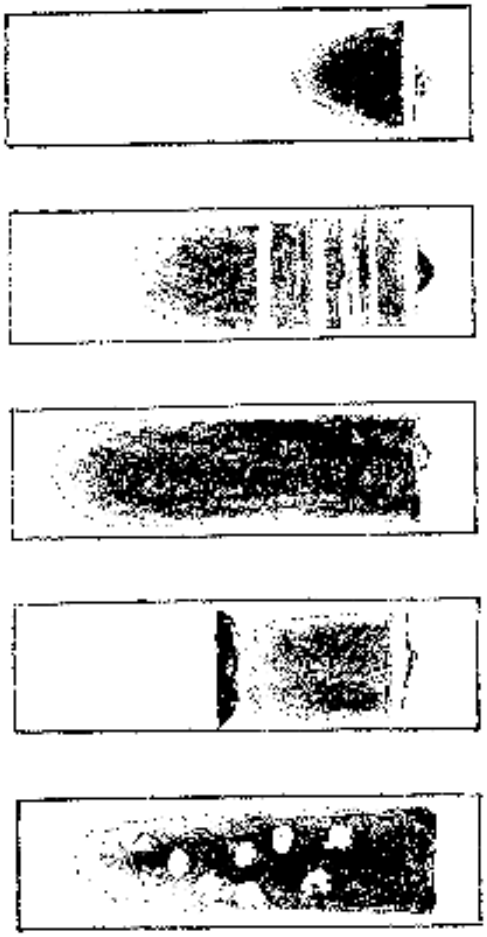
2. นำ slide อีกแผ่นหนึ่งซึ่งมีขอบเรียบ (เรียกว่าตัวไถ) แตะที่หยดเลือดรอให้หยดเลือดกระจายตัวดีเต็ม slide ตัวไถ เอียง slide ตัวไถ ให้ทำมุมประมาณ 30-45 องศา แล้วไถเลือดไปทิศทางด้านหน้าด้วยความเร็วสม่ำเสมอไปจนสุด slide จะได้สเมียร์ความต้องการ (เลือดแผ่เป็นแผ่นบางๆ) และอาจจะเกิดปัญหากับสเมียร์เลือดดังภาพที่ 5

3. นำสเมียร์ที่แห้งแล้วมาทำการตรึง (fix smear) โดยจุ่มใน Absolute methanol 1 นาที

4. นำสเมียร์เลือดไปทำการย้อมสี โดยใช้สีไร้ท์ (Wright's stain) ในการทดลองนี้เป็นสีย้อมที่ผลิตขึ้น (reagent kit) ซึ่งเป็น Rapid Wright Stain ที่เรียกว่า Dip Quick โดย

4.1 จุ่มใน Solution A (สีแดง) 10 วินาที
4.2 จุ่มล้างในน้ำ
4.3จุ่มใน Solution B (สีน้ำเงิน) 10 วินาที
4.4 จุ่มล้างในน้ำ

5. ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายสูงสุด (oil immersion, x100) บริเวณที่เม็ดเลือดแดงกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน นับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว จากเม็ดเลือดขาวทั้งหมด 100 เซลล์ รายงานแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยนับตามแนวลูกศร (ภาพที่ 6)

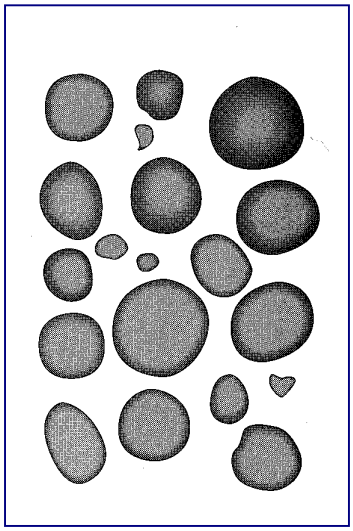


ภาพที่ 5 ลักษณะของสเมียร์เลือดที่เกิดจากปัญหาต่างๆ a) เลือดน้อยเกินไป b) ความเร็วไม่สม่ำเสมอ c) เลือดมากเกินไป d) ไถสไลด์ชนฝือที่ถือสไลด์ e) สไลด์มีไขมันติด

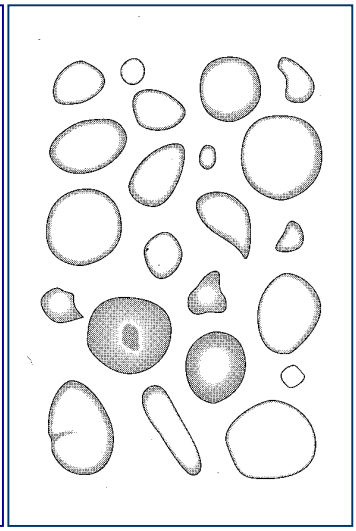
ภาพที 6 ลักษณะของสเมียร์เลือดทีดีและการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวจากสเมียร์เลือด

หมายเหตุ - ให้สังเกตดูการติดสีของเม็ดเลือดแดง ซึ่งเม็ดเลือดแดงที่ปกติบริเวณที่ไม่ติดสีต้องมากกว่า 1/3

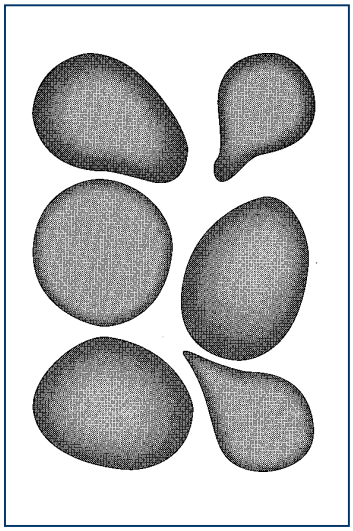
- ดูลักษณะการติดสีตลอดจนจำนวนของเกล็ดเลือดในแต่ละ field (คนปกติจะพบเกล็ดเลือด ประมาณ 5-25 cells/oil field)



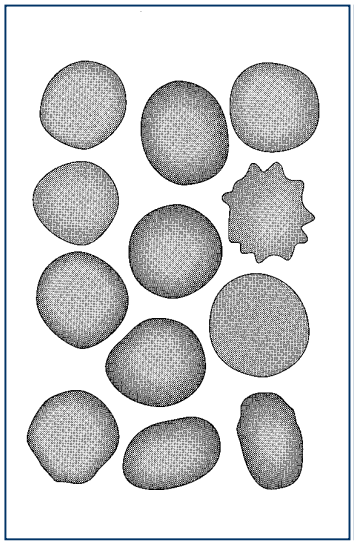
Macrocytosis



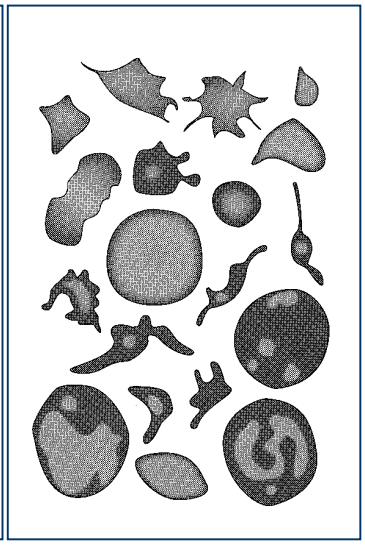
Microcytosis



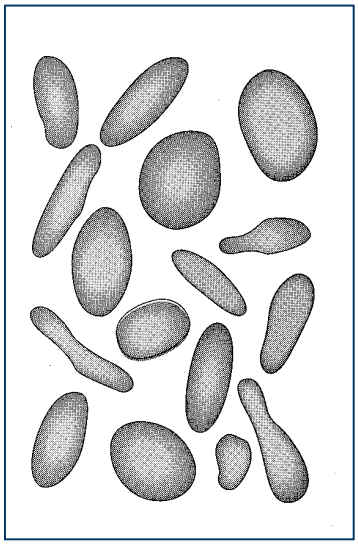
Normocytosis



Poikolocytosis



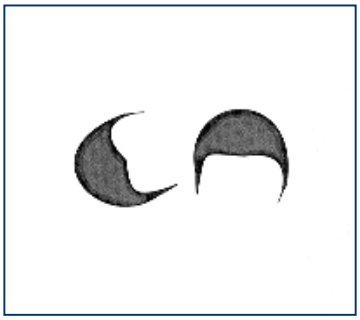
Anisocytosis



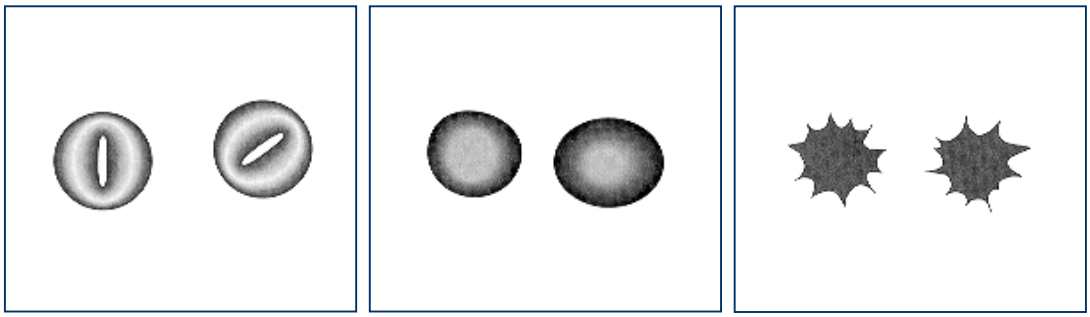
Ovalocytosis

Schistocyte

Acanthocyte

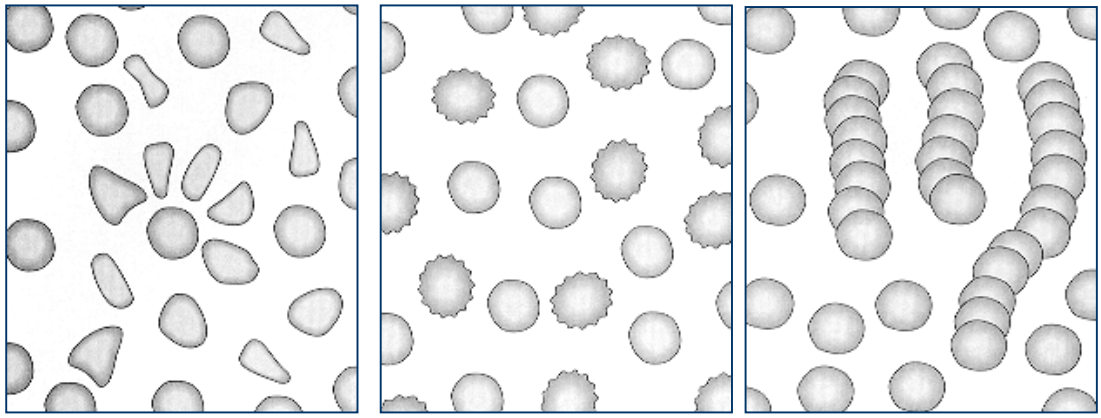


Helmet



Stomatocyte Normal Burr

Pointed Sickle Target



Design formation Crenation rouleau

Drabkin solution

Sodium bicarbonate	1.0 gm.
Potassium cyanide (KCN)	0.05 gm.
Potassium ferriccyanide [$K_3Fe(CN)_6$]	0.20 gm.
Add distalled water to	1000 ml.

Grower's solution

Sodium sulfate	12.5 gm.
Glacial acetic acid	33.3 ml.
Distalled water	200 ml.

Turk's solution

Gentain violet (1% aqueous)	1 ml.
Glacial acetic acid	3 ml.
Distalled water	100 ml.

เอกสารอ้างอิง

ยุพิน อนิวรรตอังกูร และคณะ. 2529. ปฏิบัติการจุลทรรศน์วินิจฉัย เล่ม 1. ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล. 2524. คู่มือโลหิตวิทยาโครงการตำราศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ถนอมศรี ศรีชัยกุล, วิชัย อติชาตการ, แสงสุรีย์ จูฑา และคณะ 2529. ตำราโลหิตวิทยา : การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. ยูนิตี้พับลิเคชั่น กรุงเทพฯ.

ธรรมศักดิ์ ประสานพานิช 2516. เวชศาสตร์ชันสูตร ภาคโลหิตวิทยา ไทยวัฒนาพานิช กรุงเทพฯ.

Diggs L.W, D. Sturm and A. Bell.1970. The Morphology of Human Blood Cells. Abbott Laboratories, North Chicago.

Hawkey C.M. and T.B. Dennett. 1989. Comparative Veterinary Hematology. Iowa State University Press. Iowa.

Hean P.J. 1995. Principle of Hematology. Wm. C. Brown Publishers USA.

##############################