จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๓๗

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนม โดยวิธีไซโตเคมี

(The Study on Bovine Leukemia in Dairy Cattle by Using Cytochemical Staining Techniques)

โดย

อัจฉริยา ไศละสูต

วิมล โพธิวงศ์

SF 81
อ 122
2541

กันยายน ๒๕๔๑

ภาควิชาพยาธิวิทยา และ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

B 1498 7796

ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. ๒๕๓๗

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนม โดยวิธีไซโตเคมี

(The Study on Bovine Leukemia in Dairy Cattle by Using Cytochemical Staining Techniques)

โดย

อัจฉริยา ไศละสูต

วิมล โพธิวงศ์

ห้องสมุด
คณะสัตวแพทยศาสตร์
ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก
ห้องสมุดคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
เลขที่รับ 673
วันที่ 27 ตุลาคม 2541

กันยายน ๒๕๔๑

ภาควิชาพยาธิวิทยา และภาควิชากายวิภาคศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SF81
.ค182
2541

สารบัญ

	หน้า
- บทคัดย่อ	I
- Summary	II
- บทนำ	1
- อุปกรณ์ และวิธีการ	5
- ผลการศึกษา	7
- ตาราง และภาพ	9
- วิจารณ์และสรุปผล	16
- กิตติกรรมประกาศ	22
- เอกสารอ้างอิง	23

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนม โดยวิธีไซโตเคมี

อัจฉริยา ไศละสูต
วิมล โพธิวงศ์

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดโคนมอายุมากกว่า 3 ปี จำนวน 80 ตัว โดยตรวจทางซีรั่มวิทยาวิธี Agar Gel Immunodiffusion Test (AGID) พบว่าโคนมเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยให้ผลบวกต่อ AGID คิดเป็นร้อยละ 22.50 (18/80) โคนมกลุ่มที่ศึกษาเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดไม่แสดงอาการของโรค ได้ติดตามศึกษาทางโลหิตวิทยาจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และลิมโฟไซต์ เป็นเวลา 6 เดือน ในกลุ่มโคนมเป็นโรค (5 ตัว) และโคปกติ (4 ตัว) พบว่าค่าทางโลหิตวิทยาทั้งสองกลุ่มอยู่ในเกณฑ์ปกติ และไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ลักษณะของเม็ดเลือดขาวแยกชนิดจากฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้นของโคนมเป็นโรค ไม่พบเซลล์ชนิดอ่อน หรือลิมโฟบลาสท์จากการย้อมด้วยสีไร้ท์จิมซ่า ผลการศึกษาทางไซโตเคมีของฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้นคล้ายคลึงกันในโคนมทั้งสองกลุ่ม ผลของปฏิกิริยาไซโตเคมี ได้แก่ Sudan Black B (SBB), Periodic Acid Schiff (PAS) และ Acid Phosphatase (AcP) เป็นลักษณะปฏิกิริยาของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต คือ SBB ให้ผลบวกกับเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล PAS ให้ผลบวกกับเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล และลิมโฟไซต์ AcP ให้ผลบวกกับลิมโฟไซต์ทุกชนิด และเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูลบางชนิด การศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาโรคของระบบเลือดและน้ำเหลืองในสัตว์

คำสำคัญ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว โคนม โลหิตวิทยา ไซโตเคมี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The Study on Bovine Leukemia in Dairy Cattle by Using Cytochemical Staining Techniques

Achariya Sailasuta
Wimon Pothiwongse

Abstract

The study on Bovine Leukemia in dairy cattle had been performed. The blood samples from eighty, above - 3 - year - old dairy cattle were collected for checking the prevalence of Bovine Leukemia infection in the herd. The cows which having serologically positive to Agar Gel Immunodiffusion Test (AGID) were at 22.50 percent (18/80). The hematological studies were done in the studied groups during 6 months of observation. The total leukocyte and lymphocyte count from both groups were in normal limit and revealed no statistically difference ($P < 0.05$) between the two groups. Both blood and buffy coat smears by Wright giemsa stain demonstrated neither blast cell nor lymphoblast. Cytochemical studies of the blood and buffy coat smear from both groups were similar in appearance. Cytochemical reactions of Sudan Black B (SBB), Periodic Acid Schiff (PAS) and Acid Phosphatase (AcP) showed the positivity as in normal haemic cells in blood circulation : SBB positivity to granulocytes, PAS positivity to granulocytes and lymphocytes and AcP positivity predominantly lymphocytes and some granulocytes. These obtained results would provide basic knowledges for the clinical applications of the hemopoietic diseases in domestic animals.

Keywords : Bovine Leukemia, Dairy cow, Hematology, Cytochemistry

บทนำ

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค (Enzootic Bovine Leukosis , EBL) เกิดจากเชื้อ Bovine leukemia virus (BLV) เป็น Retrovirus เป็นรูปแบบหนึ่งของโรคลูคีเมีย (Leukemia adult form) ที่สัมพันธ์กับ HTLV (Human T-cell leukemia virus) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคเอดส์ในคน สำหรับเชื้อ BLV พบในโค กระบือ แพะ แกะ เชื้อไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติของเม็ดเลือดขาว มีผลให้เกิดเนื้องอกตามอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น ตับ ปอด ม้าม หัวใจ (Blood and Radostits, 1989) ทำให้สัตว์มีสุขภาพทรุดโทรม เบื่ออาหาร โลหิตจาง กล้ามเนื้ออ่อนแอ น้ำหนักลด น้ำนมลด บางรายอาจผสมไม่ติด แท้งลูก พบในโคนมมากกว่าโคเนื้อ การติดเชื้อส่วนใหญ่พบในโคอายุมากกว่า 1 ปี และเกิดกับทุกสายพันธุ์ โรคนี้มักเป็นแบบเรื้อรัง ส่วนใหญ่สัตว์จะไม่แสดงอาการให้เห็นแต่จะเป็นตัวอมโรคและแพร่เชื้อให้ตัวอื่น สามารถติดต่อจากแม่โคไปสู่ลูกโคได้โดยผ่านทางรก น้ำนมและนมน้ำเหลือง และติดต่อผ่านทางเครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน เข็มเจาะเลือด อุปกรณ์สักเบอร์ เครื่องมือผ่าตัด โดยมีแมลงดูดเลือดเป็นพาหะสำคัญ (Mohanty and Dutta, 1981)

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคอาจแบ่งได้ 2 รูปแบบใหญ่ คือ Enzootic form และ Sporadic from

1. Enzootic form (Adult form)

พบโคนมเป็นโรคนี้มากกว่า 80 % จากการติดเชื้อ Bovine leukemia virus (BLV) เกิดในโคอายุตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป จึงจัดเป็น Adult form โคที่ติดเชื้อ BLV นี้ ประมาณ 1/3 จะพบจำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติ (persistent lymphocytosis, PL) และ 100 % จะสร้างแอนติบอดี้ (antibody) ต่อเชื้อ BLV

อาการของโรคคือ ซูบผอม น้ำหนักตัวลด น้ำนมลด โลหิตจาง (anemia) กล้ามเนื้ออ่อนแอ ต่อมน้ำเหลืองขยายโตขึ้น บางรายอาจผสมไม่ติด แท้งลูก สัตว์อาจไม่แสดงอาการให้เห็นแต่จะเป็นตัวอมโรคและแพร่เชื้อให้ตัวอื่น (Blood and Radostits, 1989)

2. Sporadic from

พบในสัตว์อายุน้อยกว่า 3 ปี ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 รูปแบบ คือ

2.1 Calf form (Juvenile form) พบในลูกโคอายุน้อยกว่า 6 เดือน ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุ อาการของโรค คือ ลูกโคจะมีความผิดปกติของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกายขยายใหญ่ขึ้นเฉียบพลัน อาจตายใน 2- 8 สัปดาห์

2.2 Thymic form พบในโคอายุน้อยกว่า 2 ปี (6 - 24 เดือน) โดยส่วนใหญ่ จะพบในโคเนื้อมากกว่าโคนม และยังไม่ทราบสาเหตุ อาการของโรค คือ มีการขยายตัวของต่อมไทมัส (thymus) ต่อมน้ำเหลืองโต ตายภายใน 2 - 10 สัปดาห์

2.3 Skin form (Cutaneous form) พบในโคอายุน้อยกว่า 1 - 3 ปี ซึ่งแบบนี้จะพบมากที่สุดในกลุ่ม sporadic form แต่ก็ยังน้อยเมื่อเทียบกับ Enzootic form และยังไม่ทราบสาเหตุ อาการของโรค คือ เกิดผื่นนูนออกมาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 - 5 เซนติเมตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ คอ หลัง ตะโพก และโคนขา ต่อมน้ำเหลืองบวมพอง และก่อให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะภายใน เป็นผลให้โคอ่อนแอ และตายได้ (Blood *et al.*, 1984)

ปัจจุบันพบโรคนี้ในโคนมหลายประเทศเช่น ในสหรัฐอเมริกา หลายประเทศในยุโรป ญี่ปุ่น (Onuma *et al.*, 1978) อินเดีย (House *et al.*, 1975) ฟิลิปปินส์ (Masangkey and Lieberman, 1982) เป็นต้น สำหรับประเทศไทย จากการศึกษาความชุกของการติดเชื้อ bovine leukemia virus ของโคนมในภาคกลางของประเทศไทย มีการกระจายโดยทั่วไปเฉลี่ย 13.39% และพบมากที่สุดคือ จังหวัดลพบุรี คิดเป็น 25.90% (รื่นฤดีและคณะ,2537) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบโรคนี้ในโคนมในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือเฉลี่ย 7.01% (พุทธชาดและคณะ,2537) และในภาคเหนือพบโรคนี้เฉลี่ย 7.67% (ชัยวัธน์และคณะ,2537) และพบโรคนี้ในโคนมเขตอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี 19.6% (ยรรยงและคณะ,2528)

การชันสูตรโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวในโคนม มีหลายวิธีในการที่จะตรวจตามลักษณะพยาธิ-กำเนิดของโรค โดยสามารถเลือกใช้เทคนิคต่าง ๆ ที่แพร่หลายในปัจจุบัน เช่น

1. เทคนิคทางโลหิตวิทยา

1.1 ตรวจนับจำนวนเม็ดโลหิตขาวในกระแสเลือด สัตว์ป่วยจะมีจำนวนเม็ดโลหิตขาวชนิดลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) ในกระแสเลือดสูงขึ้นโดยเฉพาะพบเซลล์ที่ยังอ่อน จำนวนลิมโฟไซต์จะเพิ่มจาก 6,000 เซลล์เป็น 15,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (Straub, 1978)

1.2 หาจำนวนของลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดของสัตว์ป่วย โดยเทียบกับ Bendixen's key (1965) สัดส่วนของลิมโฟไซต์จะเพิ่มจาก 50% เป็น 65% หรือ > 8500 เซลล์/ลบ.มม. (Straub, 1978)

1.3 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอ่อนในกระแสเลือด ถ้ามีเซลล์อ่อนมากกว่า 25% ของจำนวนลิมโฟไซต์ทั้งหมด ถือว่าสัตว์มีความผิดปกติ (Blood *et al.*, 1984)

2. เทคนิคทางไวรัสวิทยา

เป็นการตรวจยืนยันการติดเชื้อ BLV ทำได้โดยการเจาะเลือด นำมาแยกเม็ดโลหิตขาว แล้วนำไปเลี้ยงรวมกับเซลล์จากม้ามแกะ หรือนำเลือดออกจากสัตว์ป่วยไปฉีดเข้าแกะที่ไม่มีแอนติบอดี้ต่อโรคนี้ จากนั้นยืนยันการมีเชื้อไวรัสชนิดนี้ โดยใช้

2.1 วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์

2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.3 Radioimmunoassay (Bex *et al.*, 1979 และ Portetelle and Mammerickx, 1987)

2.4 Syncytial Infectivity Assay (Benton *et al.*, 1978)

2.5 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน การศึกษาถึงอนุภาคของไวรัสโดยการเพาะเลี้ยง เซลล์เม็ดเลือดขาวจากโคนมที่ติดเชื้อ BLV สามารถศึกษาโครงสร้างผิดปกติของเม็ดเลือดขาวนั้นได้โดยจะสังเกตเห็นลักษณะของ Nuclear pockets ที่เป็นโครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดลิมโฟไซต์ ซึ่งปกติจะพบน้อยมากในสัตว์ที่ไม่ติดเชื้อ BLV และพบจำนวนเพิ่มขึ้นมากในโคนมที่ติดเชื้อ BLV จัดเป็น morphological marker สำหรับ BLV อย่างไรก็ตามการตรวจยืนยันเชื้อไวรัสตามวิธีดังกล่าวเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมการตรวจหาจากซีรั่มวิทยา (Miller and Schmerr, 1987)

3. <u>เทคนิคทางซีรั่มวิทยา</u>

ลูกโคที่เกิดจากแม่โคที่ติดเชื้อนี้ประมาณ 20% จะเกิดการติดเชื้อในมดลูกและตรวจจะพบแอนติบอดี้ต่อ BLV ในกระแสโลหิตตั้งแต่แรกคลอด ส่วนอีก 80% จะไม่เกิดการติดเชื้อ และไม่พบแอนติบอดี้ต่อ BLV ในกระแสโลหิตเมื่อแรกคลอด อย่างไรก็ตามลูกสัตว์เหล่านี้จะได้รับแอนติบอดี้จากแม่โคโดยผ่านทางนมน้ำเหลืองซึ่งแอนติบอดี้ดังกล่าวจะคงอยู่ในกระแสโลหิต นานประมาณ 2-7 เดือน และเมื่อสัตว์ติดเชื้อ BLV จะทำให้มีการสร้างแอนติบอดี้ขึ้นมาต่อต้านการตรวจโดยเทคนิคซีรั่มวิทยาซึ่งทำได้ง่ายมีหลายวิธี เช่น

3.1 วิธี Agar Gel Immunodiffusion Test (AGID)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาว่ามีการติดเชื้อในฝูงสัตว์หรือไม่ ความแม่นยำสูง (Miller, 1980, Onuma *et al.*, 1978)

3.2 วิธี Radio-Immunoassay (RIA)

เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการตรวจยืนยันการติดโรคในโคแต่ละตัว เนื่องจากผลที่ได้มีความแน่นอนสูง แต่มีความยุ่งยากในวิธีการที่ต้องใช้กัมมันตภาพรังสีและเครื่องมือพิเศษเฉพาะ นิยมใช้สำหรับการตรวจเพื่อกำจัดตัวป่วยออกจากฝูง (Bex *et al.*, 1979 และ Portetelle *et al.*, 1980)

3.3 ใช้ Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)

เป็นที่เชื่อกันว่าวิธีนี้มีความไวกว่าวิธีอื่น ๆ และสามารถใช้ตรวจในน้ำนมได้ด้วย แต่ค่อนข้างยุ่งยากในการเตรียม อย่างไรก็ดีวิธีนี้ก็เป็นที่ยอมรับทั่วไป (Portetelle และ Mammerickx, 1987)

3.4 วิธี Protein Immunoblot Test

ใช้ในการตรวจจากซีรั่ม เชื่อว่าให้ผลการตรวจไวกว่าวิธี AGID

4. <u>เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา</u>

การตรวจพบรอยโรคของมะเร็งต่อมน้ำเหลือง โดยการตรวจชิ้นเนื้อหรือตัวอย่างเนื้อเยื่อจากสัตว์ที่ตายแล้ว โดยเฉพาะต่อมน้ำเหลืองที่ขยายใหญ่หรือมดลูกที่มีรอยโรค อย่างไรก็ดีการตรวจทางซีรั่มวิทยานั้นไม่สามารถใช้ได้กับ Bovine Leukemia ที่เป็น calf form, thymic form และ skin form ดังนั้น

การตรวจอุบัติการณ์ของโรคนี้ยังคงต้องอาศัยการตรวจทางเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยาร่วมด้วย โดยมักจะพบการเกิด lymphoid tumor ที่สามารถบ่งบอกถึงชนิดของก้อนเนื้องอก (Neoplasia) ได้ (Blood *et al.*, 1984)

Thurmond และ Burridge (1982) ได้รายงานเกี่ยวกับการส่งออกโคนมของประเทศในกลุ่ม European Economic Community (EEC) กำหนดให้มีการตรวจโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนมด้วยวิธีอย่างเดียวที่เป็นที่ยอมรับของกลุ่ม EEC นี้คือ วิธี AGID โดยใช้ glycoprotein antigen (gp 51) และยังเป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไปมากที่สุดเพราะเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ให้ผลจำเพาะมีความแม่นยำและความไวสูง (Miller, 1980; Onuma *et al.*, 1978) ปัจจุบันสำหรับประเทศไทยในการนำเข้าโคนมจากต่างประเทศจะใช้วิธี AGID ในการตรวจโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพื่อควบคุมโรคเช่นกัน แต่โดยเหตุที่แอนติเจนมีราคาแพงและมีความยุ่งยากในการสั่งซื้อจึงมีการเตรียมแอนติเจนขึ้นใช้เองในประเทศเพื่อการควบคุมโรคนี้ รวมทั้งการศึกษาความชุกของโรค (รื่นฤดี และคณะ, 2537)

<u>เทคนิคไซโตเคมี</u>

การตรวจทางไซโตเคมี (Cytochemistry) คือการศึกษาถึงส่วนประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ เช่น เอนไซม์ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดของเซลล์ ซึ่งมีเซลล์ต้นกำเนิดที่ต่างกัน เทคนิคไซโตเคมีที่นำมาใช้ทางโลหิตวิทยามีบทบาทสำคัญมากในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลูคีเมียในคน (Bennett and Reed, 1979)

ประโยชน์ของการศึกษาทางไซโตเคมี คือ การศึกษาเซลล์ตัวอ่อน (blast cell) โดยย้อมดูด้วยสีไรท์ (Wright's stain) ส่วนหนึ่งจะไม่สามารถจำแนกชนิดเซลล์ได้ การย้อมทางไซโตเคมีจะช่วยในการวินิจฉัยและแยกชนิดของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน, แยกแกรนูโลซัยท์ตัวอ่อน, โมโนซัยท์ตัวอ่อน ออกจากลิมโฟบลาสท์ ใน Lymphoblastic leukemia แยกเซลล์ในกลุ่ม chronic lymphocytic leukemia จาก ลิมโฟไซต์ปกติ เป็นต้น ซึ่งนับเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจวินิจฉัยแยกประเภท Leukemia โดยหลักการในการทดสอบแต่ละวิธีแตกต่างกันไป (ศรีประภา และอนงค์, 2534)

เทคนิคของวิธีการย้อมทางไซโตเคมีที่เป็นที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน เช่น Alkaline Phosphatase, Myeloperoxidase, Sudan Black B (SBB), Naphthyl Acetate Esterase (NAE), Periodic Acid Schiff (PAS), Oil red O, Acid Phosphatase, Iron stain เป็นต้น

เนื่องจากการย้อมทางเทคนิคไซโตเคมี (Cytochemical stain) มีหลายวิธี ดังนั้นจะต้องเลือกใช้เฉพาะการย้อมที่มีความจำเพาะ ซึ่งช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยทำให้ประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และได้ผลตรงเป้าหมาย

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ เพื่อแยกชนิดของเซลล์ต้นกำเนิด ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในคนนั้นมีความสำคัญเกี่ยวกับการวางแผนการรักษา โดยอาศัยคุณสมบัติทางลักษณะของเซลล์ (Morphology) จากการย้อมต่าง ๆ ทางเทคนิคไซโตเคมี (Hayhoe and Quaglino, 1988)

สำหรับวิธีการตรวจนั้น ก่อนอื่นต้องเลือกฟิล์มเลือดบาง (blood smear) ซึ่งควรพบเซลล์อ่อน (blast cell) อยู่มากพอสมควร จากนั้นย้อมด้วย Wright's stain เพื่อแยกลักษณะเซลล์เป็นการจำแนกเบื้องต้น (Screening test) จากนั้นใช้เทคนิคไซโตเคมีต่อไป ซึ่งจะให้ผลได้แม่นยำมากขึ้น อาจมีการเลือกใช้เทคนิคที่ถูกต้องชนิดเดียวหรือใช้ผลการย้อมแต่ละเทคนิคร่วมกัน เพื่อเป็นการวินิจฉัยยืนยัน ส่วนการใช้ specific marker อื่น ๆ นั้นจะใช้กรณีที่ผลทางไซโตเคมีมีความขัดแย้งกันหรือไม่ชัดเจน (ศรีประภา และอนงค์, 2534)

ด้วยเหตุที่โรคมะเร็งเลือดขาวในโคนมมีผลต่อสุขภาพของโคนมก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจค่อนข้างสูง ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเฝ้าระวังโรค ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำวิธีการชันสูตรโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวโดยวิธีการทางไซโตเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้และยอมรับในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในคน นำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนม เพื่อจำแนกชนิดของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemic cell) ซึ่งบ่งเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งไม่สามารถวินิจฉัยได้ในการทดสอบทางซีรั่มวิทยา ทั้งนี้อาศัยการเลือกตัวอย่างโคนมจากอายุ และตรวจผลทางซีรั่มวิทยาพบว่าติดเชื้อ BLV โดยทดสอบด้วยวิธี Agar Gel Immunodiffusion test (AGID) ใช้แอนติเจนชนิด Glycoprotein 51 (gp 51) (Miller and Schmerr, 1987) รวมทั้งทำการศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางโลหิตวิทยาที่เกี่ยวข้องกับโรคนี้ โดยเปรียบเทียบกับโคนมปกติ เพื่อนำข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการศึกษามาใช้ในการพัฒนาวิธีการชันสูตรโรค อันจะเป็นทางหนึ่งในการควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การศึกษาวิธีการไซโตเคมีเพื่อใช้ในการชันสูตรโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนม ทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาของโคนมที่เป็นโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างของเลือด
2. ขั้นตอนการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ
3. ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีการดำเนินการ

1. <u>ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างของเลือด</u>

เก็บตัวอย่างเลือดโคนม จากฟาร์มโคนมขององค์การส่งเสริมการเลี้ยงโคนมแห่งประเทศไทย อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี โดยเลือกจากกลุ่มโคนมเพศเมียที่เคยมีประวัติตรวจพบโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยวิธีการตรวจทางซีรั่มวิทยา วิธี AGID ให้ผลบวก (+ve) จากข้อมูลเบื้องต้นของการสำรวจสภาวะของโรคโคนมของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์รวมทั้งมีลักษณะอาการภายนอก ได้แก่ ผอม น้ำหนักลด ปริมาณการให้น้ำนมลดลง และอายุมากกว่า 3 ปีขึ้นไปจำนวนทั้งสิ้น 80 ตัว มีขั้นตอนการเก็บตัวอย่างดังนี้

1. เจาะเลือดจากบริเวณโคนหาง ปริมาตร 20 มล. แบ่งเลือดเป็น 3 ส่วน

2. ส่วนหนึ่งเก็บในขวดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว (EDTA) (1.0-2.0 มก./มล. ของเลือด) เพื่อเก็บเลือดครบ (Whole blood) ประมาณ 2-3 มล. แบ่ง 2 ขวด โดยเก็บแช่ที่ 4°ซ ได้นาน 24 ชั่วโมงหลังเจาะเลือด

3. ส่วนที่สองเก็บในขวดที่มี 1% Haparin Solution (0.1 มล. ต่อเลือด 5.0 มล.) เก็บเลือดครบ (Whole blood) ประมาณ 2-3 มล. เพื่อทำฟิล์มเลือดบาง (blood smear) ประมาณ 50 สไลด์ต่อ 1 ตัวอย่างและปั่นแยกชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ทำฟิล์มเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (buffy coat smear) ประมาณ 20 สไลด์ต่อ 1 ตัวอย่าง หลังจากแห้งแล้วจึง fix ด้วย fixing agent ที่เฉพาะเจาะจงเพื่อเก็บรักษาสไลด์สำหรับการย้อมแต่ละวิธีทางไซโตเคมี

4. ส่วนที่สามเก็บใส่หลอดปั่น (Centrifuge tube) เพื่อแยกซีรั่ม ประมาณ 10-15 มล. ทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว ปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้แรงเหวี่ยง 850-1000 g นาน 10 นาทีเก็บที่ -20°ซ จนกระทั่งนำมาทดสอบทางซีรั่มวิทยาด้วยวิธี Agar gel immunodiffsion test (AGID) (รื่นฤดี และคณะ, 2537)

2. <u>ขั้นตอนการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ</u>

2.1 ยืนยันการตรวจหาโคนมเป็นโรคที่ให้ผลบวกจากการนำซีรั่มมาทดสอบโดยวิธี AGID ที่กลุ่มงานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์ เพื่อทำการแยกกลุ่มโคนมที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและกลุ่มโคนมปกติ ติดตามเก็บเลือดโคนมที่ให้ผลบวกต่อ AGID และโคนมปกติทุกเดือน ในระยะเวลา 6 เดือน และตรวจสอบวิธี AGID นี้ซ้ำทุก 3 เดือน

2.2 นำเลือดครบในขวดที่มี EDTA มาตรวจทางโลหิตวิทยา (Hematology) ทันที ประกอบด้วย ปริมาณเม็ดเลือดแดง, ปริมาณเม็ดเลือดขาว ค่าฮีมาโตคริต, ค่าฮีโมโกลบิน, การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ทั้งนี้เพื่อเป็นการศึกษากลุ่มโคนมที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว หลักเกณฑ์ที่ใช้ได้แก่ ตัวอย่างเลือดที่มีเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์สูง (Lymphocytosis) โดยอาศัย Bendixen's key (Miller, 1980) และพบลิมโฟบลาสท์ (lymphoblast) จากการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวในสไลด์ที่ย้อมด้วยสีไร้ท์จิมซ่า (Wright giemsa stain) และเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ กับกลุ่มโคนมที่ปกติ

2.3 นำฟิลม์เลือดบางที่ผ่านการรักษาสภาพ (fixation) โดยน้ำยาคงสภาพที่เฉพาะเจาะจงแต่ละวิธีการย้อม แล้วมาทดสอบทางเทคนิคไซโตเคมี ตามวิธีการย้อมต่าง ๆ ดังนี้

2.3.1 ย้อม Sudan Black B (SBB) (Sigma → Sigma Diagnostics kit, Procedure No. 380) โดยวิธีของ Hayhoe และ Quaglino (1988) เพื่อแยกกลุ่ม Myeloid Leukemia และ granulocyte โดยเซลล์ กลุ่ม Myeloblast จะให้ผลบวกสำหรับ SBB ดังนั้นส่วนที่ให้ผลลบกับ SBB อาจเป็น กลุ่ม Lymphoid Leukemia ซึ่งสามารถวิเคราะห์แยกในขั้นตอนต่อไป

2.3.2 ย้อม Periodic Acid Schiff (PAS) (Sigma → Sigma Diagnostics kit, procedure No. 395) โดยใช้วิธีของ Thompson และ Hunt (1966) เป็นการแยกกลุ่ม Lymphoid leukemia

2.3.3 ย้อม Acid Phophatase (AcP) (Sigma→ Sigma Diagnostics kit, procedure No. 180) โดยวิธีของ Goldberg และ Burka (1962) วิเคราะห์ว่าเป็น T, B หรือ Null cell type Leukemia โดย Lymphoid leukemia ในกลุ่ม T-cell leukemia จะให้ผลบวก ส่วน Pre B -cell , B -cell และ Null cell Leukemia จะให้ผลน้อยกว่าถึงผลลบ

3. ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

นำเอาผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิธี Student T Test

ผลการศึกษา

1. จากการเก็บตัวอย่างเลือดโคนมเพื่อตรวจหาโคนมติดเชื้อ BLV ด้วยวิธี AGID พบว่า โคนมให้ผลบวกต่อการตรวจ จำนวน 18 ตัว จากโคนมที่ศึกษารวมทั้งสิ้น 80 ตัว คิดเป็นร้อยละ 22.50

2. โคนมที่ให้ผลบวกต่อวิธี AGID ทุกตัว ไม่แสดงอาการป่วยให้เห็นอย่างชัดเจน เป็นโคนมที่ติดเชื้อ BLV โดยไม่แสดงอาการของโรค

3. จากการศึกษาผลการตรวจทางโลหิตวิทยาโดยเฉลี่ยโคนมที่เป็นโรค BLV และโคปกติ จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total white blood cell) จะมีปริมาณสูงกว่า 10,000 เซลล์/ลบ.ม.ม. ทั้งสองกลุ่ม ส่วนจำนวนลิมโฟไซต์ (lymphocyte count) มีจำนวน60-70 % ทั้งสองกลุ่ม ซึ่งอยู่ในระดับในเกณฑ์ควรจะเป็นโรค BLV (จำนวนลิมโฟไซต์ทั้งหมด > 8500 เซลล์/มล.) เมื่อเปรียบเทียบกับ Bendixen's key

4. จากการติดตามผลทางโลหิตวิทยา และซีรั่มวิทยาของกลุ่มโคนมทั้งสองกลุ่ม ในช่วงเวลา 6 เดือน พบว่าค่าเฉลี่ยทางโลหิตวิทยาของโคทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1 ค่าทางโลหิตวิทยาของโคนมทั้งสองกลุ่มศึกษาในแต่ละเดือนอยู่ในเกณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก และอยู่ในเกณฑ์ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 2, 3, 4, 5

5. ตัวอย่างฟิล์มเลือดบางของเลือดครบ และเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (buffy coat) ของโคนมที่เป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาว ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบ AGID จำนวน 18 ตัว นำมาศึกษาลักษณะของเม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมสีไร้ท์จิมซ่า (Wright giemsa stain) ไม่พบเซลล์ชนิดอ่อน (blast cell) หรือลิมโฟบลาสท์ (lymphoblast) ในทุกตัวอย่าง ภาพที่ 1 A, B, C, D, E, F, G, H

6. ตัวอย่างฟิล์มเลือดบางของเลือดครบ และเม็ดเลือดขาวแยกชั้นที่ได้จากโคนมที่เป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวแบบไม่แสดงอาการ และโคปกติ นำมาศึกษารูปแบบการติดสีของเม็ดเลือดขาว แต่ละชนิดโดยวิธีทางไซโตเคมี โดยการย้อม Sudan black B (SBB) Periodic Acid Schiff (PAS) Acid Phosphatase (AcP) พบว่าการติดสีของเม็ดเลือดขาวในโคที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว และโคปกติ คล้ายคลึงกัน เนื่องจากไม่พบเซลล์ชนิดอ่อน หรือลิมโฟบลาสท์ ในฟิล์มเลือดบางทุกตัวอย่าง ปฏิกิริยาทางไซโตเคมีที่ตรวจพบคือปฏิกิริยาของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิตโคปกติ

7. ผลของปฏิกิริยาทางไซโตเคมี ดังนี้

Sudan Black B (SBB) ติดสีน้ำเงินดำที่แกรนูลในไซโตปลาสม (Cytoplasm) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล (granulocyte) เช่น นิวโทรฟิล อิโอซิโนฟิล เบโซฟิล ส่วน monocyte ให้ผลลบ ภาพที่ 2 A, B, C, D, E, F

Periodic Acid Schiff (PAS) ติดสีชมพูกระจายระหว่างแกรนูล (intergranular space) ในไซโตปลาสม ของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล อิโอซิโนฟิล และ เบโซฟิล และเป็นจุดคล้ายแกรนูลกระจายในไซโตปลาสมของลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte) บางเซลล์ ในตัวอย่างเลือดโคนมที่เป็นโรค 2 ใน 18 ตัวอย่างภาพที่ 3 A, B, C, D, E

Acid Phosphatase (AcP) ติดสีน้ำตาล-แดงเข้ม โดยเฉพาะบริเวณข้างนิวเคลียส (paranuclear area) ในไซโตปลาสมของลิมโฟไซต์ ทั้งสองชนิด T-cell และ B-cell แต่จะชัดเจน และเข้มเด่นชัดมากกว่าใน T-cell และในเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล (granulocyte) ภาพที่ 4 A, B, C, D, E, F

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางโลหิตวิทยา ($\bar{x} \pm SD.$) ของกลุ่มโคนมปกติ (4 ตัว) และกลุ่มโคนมที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบไม่แสดงอาการ (5 ตัว) รวมระยะเวลาศึกษา 6 เดือน

รายการ	โคนมปกติ (n=4)	โคนมที่เป็นโรค (n=5)	ค่ามาตรฐานของโคนม*
เม็ดเลือดแดง ($x10^6$เซลล์/มล.)	5.80±1.01	6.46± 1.31	5.00-10.0
เม็ดเลือดขาว ($x10^3$เซลล์/มล.)	13.42±2.50	14.25± 3.76	4.00-12.0
ฮีมาโตคริต (%)	29.85±3.83	31.53± 3.95	24.0-46.0
ฮีโมโกลบิน (กรัม / 100 มล.)	10.11±1.58	10.69± 1.82	8.00-15.0
ลิมโฟไซต์ (%)	71.49±8.25	64.99± 8.15	25.0-75.0
นิวโทรฟิล ; Segmented (%)	16.30±7.01	23.22± 6.52	6.00-40.0
; Band (%)	0.32±0.39	0.71± 0.66	0-1.20
อิโอสิโนฟิล (%)	5.14±3.33	4.89± 3.12	0-24.0
โมโนไซต์ (%)	7.11 ±2.48	6.15± 2.24	0.25-8.4
เบโซฟิล (%)	0.02±0.07	0.04± 0.13	0-2.0

(n=จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์)

* Blood and Studdert. (1988).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm SD.$) ของจำนวนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ค่าฮีมาโตคริต และ ค่าฮีโมโกลบินของกลุ่มโคนมที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบไม่แสดงอาการ (5 ตัว) ของแต่ละเดือนที่ทำการศึกษา

เดือนที่	เม็ดเลือดแดง ($X 10^6$ เซลล์/มล.)	เม็ดเลือดขาว ($X 10^3$ เซลล์/มล.)	ฮีมาโตคริต (%)	ฮีโมโกลบิน (กรัม / 100 มล.)
1	6.01 ± 1.12	13.52 ± 2.30	30.26 ± 4.97	10.94 ± 2.27
2	6.16 ± 1.07	15.02 ± 4.47	31.12 ± 5.50	10.90 ± 3.16
3	6.62 ± 0.92	12.40 ± 3.73	31.30 ± 4.47	10.58 ± 1.75
4	6.46 ± 0.73	15.84 ± 3.75	32.26 ± 3.30	11.18 ± 0.82
5	6.61 ± 1.10	14.22 ± 5.37	31.40 ± 2.68	10.12 ± 0.67
6	6.92 ± 1.90	14.50 ± 3.37	32.82 ± 3.84	10.42 ± 1.93

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm SD.$) จำนวนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ค่าฮีมาโตคริต และ ค่าฮีโมโกลบินของกลุ่มโคนมปกติ (4 ตัว) ของแต่ละเดือนที่ทำการศึกษา

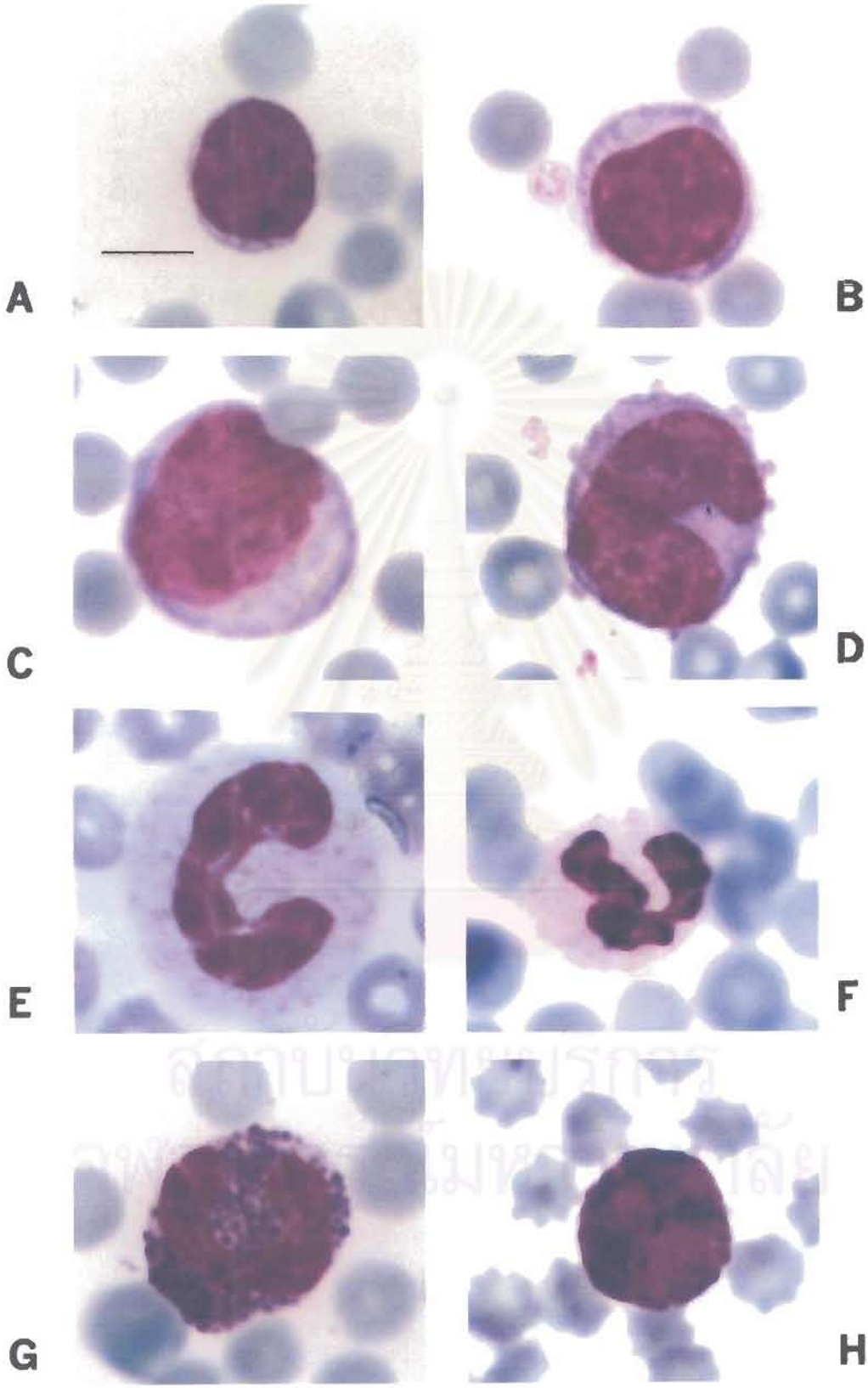
เดือนที่	เม็ดเลือดแดง ($X 10^6$ เซลล์/มล.)	เม็ดเลือดขาว ($X 10^3$ เซลล์/มล.)	ฮีมาโตคริต (%)	ฮีโมโกลบิน (กรัม / 100 มล.)
1	6.43 ± 0.88	14.00 ± 2.36	29.55 ± 1.74	11.00 ± 1.79
2	5.65 ± 0.89	13.55 ± 3.33	27.43 ± 2.05	9.83 ± 0.91
3	5.75 ± 0.96	14.00 ± 0.60	29.70 ± 6.30	9.60 ± 1.83
4	5.45 ± 1.13	12.35 ± 3.50	29.93 ± 4.75	9.88 ± 1.81
5	6.08 ± 1.32	13.23 ± 2.40	32.88 ± 3.92	10.23 ± 1.94
6	5.44 ± 1.16	13.40 ± 3.20	29.65 ± 2.76	10.10 ± 1.76

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm SD$) จำนวนเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด ของกลุ่มโคนมที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (5 ตัว) ของแต่ละเดือนที่ทำการศึกษา

เดือนที่	ลิมโฟไซต์ (%)	โมโนไซต์ (%)	นิวโทรฟิล		อีโอสิโนฟิล (%)	เบโซฟิล (%)
			Segmented(%)	Band(%)		
1	63.95±9.65	5.07±1.17	23.34±8.56	0.88±1.06	6.76±5.72	--
2	63.17±8.88	7.70±0.62	23.83±8.31	0.60±0.43	4.67±2.21	0.03±0.08
3	62.10±6.64	5.50±1.29	26.35±7.37	0.70±0.54	5.35±2.43	--
4	62.05±5.70	8.70±1.83	24.05±2.14	0.50±0.71	4.65±1.85	--
5	67.85±3.04	5.95±3.14	21.10±3.72	0.25±0.31	4.60±2.73	0.20±0.27
6	70.79±8.61	3.97±0.73	20.67±8.14	1.30±0.39	3.29±2.85	--

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm SD.$) จำนวนเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด ของกลุ่มโคนมปกติ (4 ตัว) ของแต่ละเดือนที่ทำการศึกษา

เดือนที่	ลิมโฟไซต์ (%)	โมโนไซต์ (%)	นิวโทรฟิล		อีโอสิโนฟิล (%)	เบโซฟิล (%)
			Segmented(%)	Band(%)		
1	71.09±8.11	7.29±2.71	15.10±4.95	0.17±0.24	6.30±4.22	--
2	72.29±12.57	7.79±1.99	13.54±7.36	0.96±0.46	5.42±3.10	--
3	69.54±10.84	5.50±0.91	19.81±8.90	0.21±0.25	4.90±3.33	--
4	69.44±7.23	7.25±3.18	20.38±8.87	0.19±0.24	2.63±2.09	--
5	74.00±6.83	7.13±0.32	13.19±5.28	0.06±0.13	5.43±3.26	0.13±0.15
6	72.56±7.79	7.67±4.50	15.79±4.70	0.36±0.19	6.13±4.41	--



ภาพที่ 1

คำอธิบายภาพที่ 1

ภาพเม็ดเลือดขาวแยกชนิดจากฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (Buffy coat smear) ตัวอย่างโคนมเป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาว สีไร้ท์จิมซ่า (Wright giemsa stain) ไม่พบเซลล์อ่อน หรือลิมโฟบลาสท์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เป็นค่าโดยประมาณ Bar = 5 μ]

A ลิมโฟไซต์ขนาดเล็ก (small lymphocyte) นิวเคลียสกลมติดสีม่วงเข้ม ไซโตปลาสมน้อย เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 μ

B ลิมโฟไซต์ขนาดกลาง (medium lymphocyte) นิวเคลียสกลมใหญ่กว่าขนาดเล็ก ไซโตปลาสมมีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 11 μ

C ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte หรือ prolymphocyte) นิวเคลียสกลมใหญ่ขึ้น อาจมีรอยหยักบ้าง ไซโตปลาสมมีขนาดใหญ่มากขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 μ

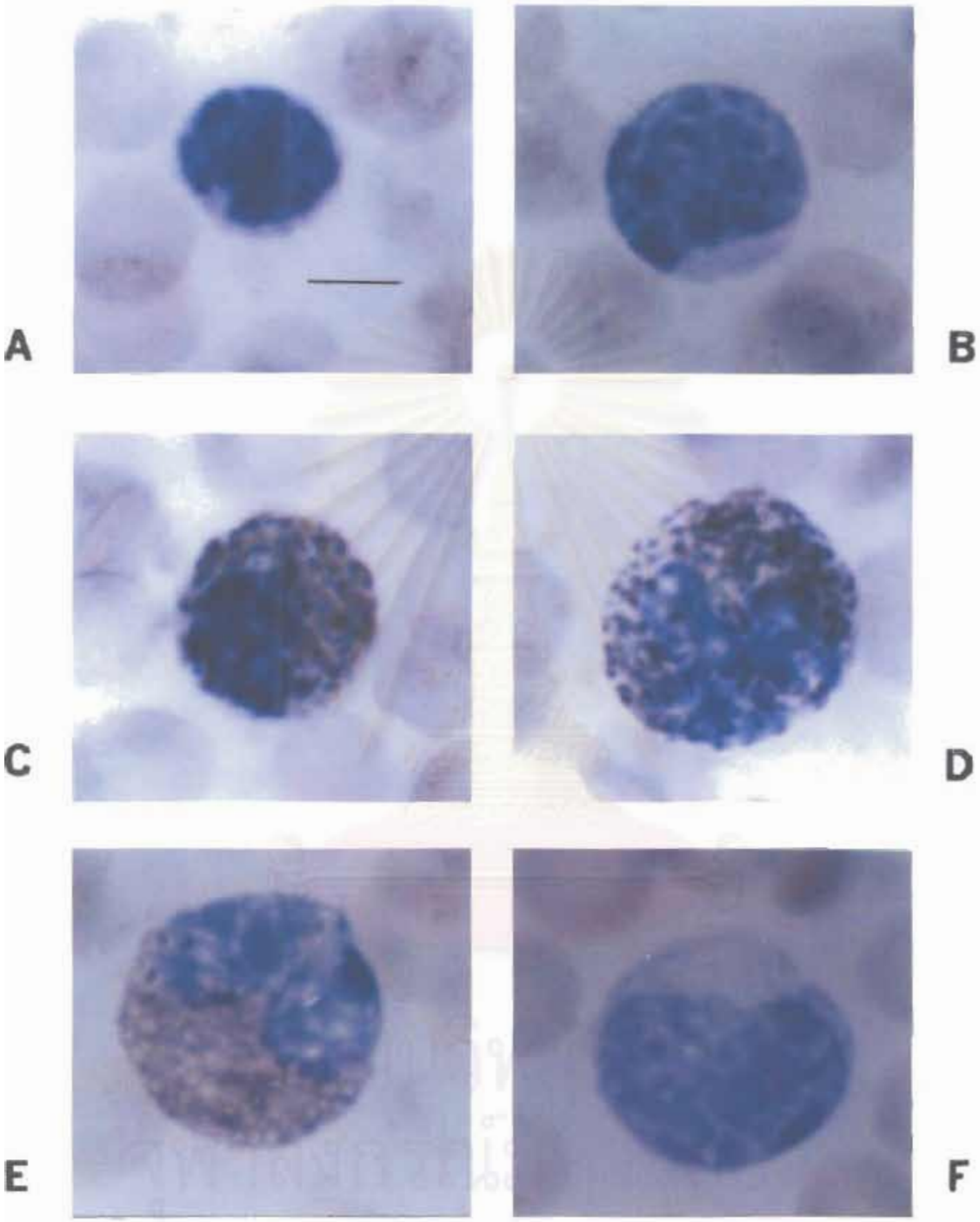
D โมโนไซต์ (Monocyte) รูปร่างกลม ขนาดใกล้เคียงกับลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ นิวเคลียสกลมและมีส่วนเว้า รูปร่างคล้ายเม็ดถั่ว เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) จะมี Cytoplasmic processes ยื่นออกมาอย่างชัดเจน เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 μ

E นิวโทรฟิล ชนิดแบนด์นิวโทรฟิล (Band neutrophil) รูปร่างกลมเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอ่อน ขนาดใหญ่กว่าโมโนไซต์เล็กน้อย นิวเคลียสรูปร่างคล้ายเกือกม้า ภายในไซโตปลาสมบรรจุแกรนูลภายใน เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 μ

F นิวโทรฟิล ชนิดเซกเม้นท์นิวโทรฟิล (Segmented neutrophil) รูปร่างกลมเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโตเต็มที่ (mature Cell) ขนาดเล็กกว่าแบนด์นิวโทรฟิล นิวเคลียสมีลักษณะเป็นก้อนพู (lobulated nuclei) ภายในไซโตปลาสมบรรจุแกรนูลภายใน เส้นผ่านศูนย์กลาง 11 μ

G อิโอซิโนฟิล (Eosinophil) รูปร่างกลม ขนาดเล็กกว่าโมโนไซต์ เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล นิวเคลียสรูปร่างคล้ายเกือกม้า ภายในไซโตปลาสมบรรจุแกรนูลขนาดใหญ่สีชมพู - แดง เส้นผ่านศูนย์กลาง 12 μ

H เบโซฟิล (Basophil) รูปร่างกลม ขนาดเล็กกว่าโมโนไซต์ เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล นิวเคลียสรูปร่างมีรอยหยัก ภายในไซโตปลาสมบรรจุแกรนูลสีเทา - ดำ ภายใน เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 μ



ภาพที่ 2

คำอธิบายภาพที่ 2

ภาพเม็ดเลือดขาวจากฟิล์มบางของเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (buffy coat smear) ของตัวอย่างเลือดโคนมเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว Sudan Black B stain (SBB) เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ SBB จะติดสีเป็นแกรนูลสีดำภายในไซโตปลาสม [Bar = 5 μ]

A ลิมโฟไซต์ขนาดเล็ก (small lymphocyte) ให้ผลลบต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ SBB

B ลิมโฟไซต์ขนาดกลาง (medium lymphocyte) ให้ผลลบต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ SBB

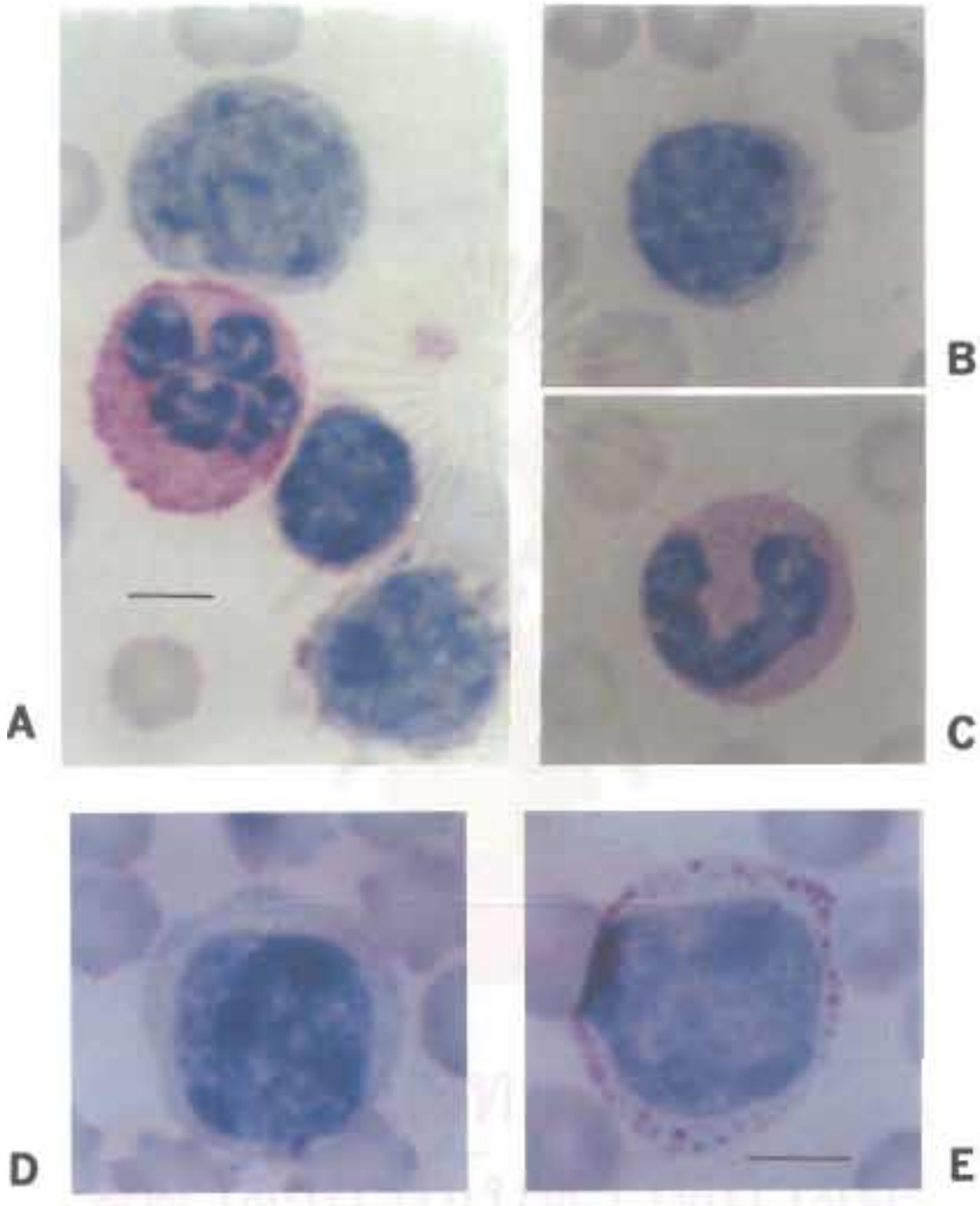
C นิวโทรฟิล ชนิดเซกเม้นท์นิวโทรฟิล (Segmented neutrophil) ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ SBB อย่างชัดเจน มีลักษณะการติดสีเป็นแกรนูลสีดำ (sudanophilic granules) อย่างชัดเจนในไซโตปลาสม

D นิวโทรฟิล ชนิดแบนด์ (Band neutrophil) ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ SBB อย่างชัดเจน มีลักษณะการติดสีเป็นแกรนูลสีดำ (sudanophilic granules) อย่างชัดเจนในไซโตปลาสม

E อิโอซิโนฟิล (Eosinophil) ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ SBB อย่างชัดเจน มีลักษณะการติดสีบริเวณขอบสีดำที่แกรนูลในไซโตปลาสม

F โมโนไซต์ (Monocyte) ให้ผลลบต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ SBB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3

คำอธิบายภาพที่ 3

ภาพเม็ดเลือดขาวจากฟิล์มบางของเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (buffy coat smear) ของตัวอย่างเลือดโคนมเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว Periodic Acid Schiff Stain (PAS) ปฏิกิริยาไซโตเคมีให้ผลบวกต่อ PAS ติดสีชมพูกระจายอยู่ระหว่างแกรนูล (intergranular space) ในไซโตปลาสมของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ส่วนใหญ่ให้ผลลบต่อลิมโฟไซต์ขนาดต่าง ๆ และพบปฏิกิริยาผลบวกต่อ PAS ในลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte) บางเซลล์โดยติดสีเป็นลักษณะคล้ายแกรนูลสีชมพูกระจายอยู่ภายในไซโตปลาสม [ภาพ A, B, C Bar = 5 μ ภาพ D, E Bar = 5 μ]

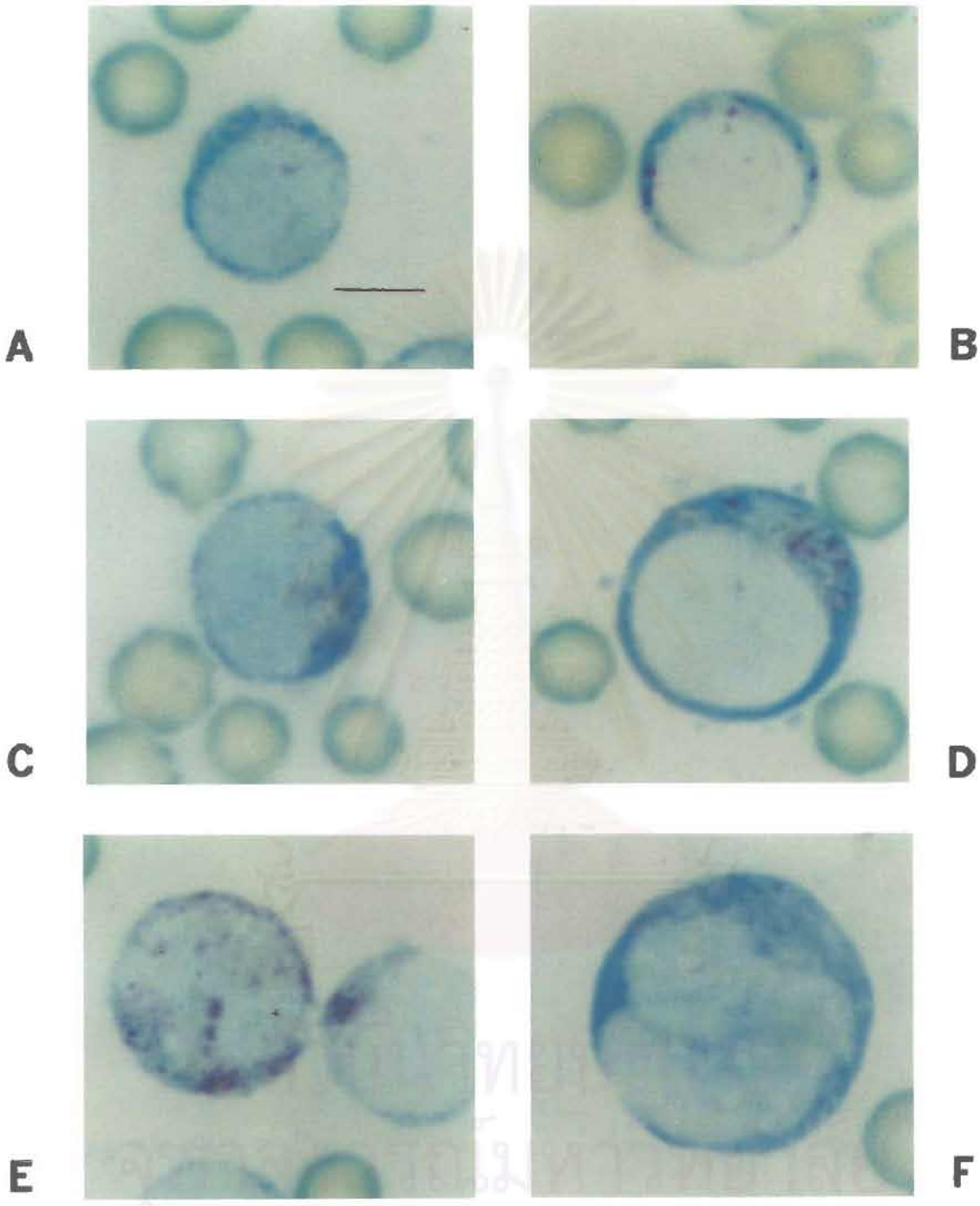
A ภาพฟิล์มเลือดบางของเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (buffy coat smear) นิวโทรฟิลชนิดเซกเม้นท์นิวโทรฟิล (segmented neutrophil) ให้ผลบวกต่อปกิกิริยาไซโตเคมีของ PAS ติดสีชมพูในไซโตปลาสม โดยรอบเป็นลิมโฟไซต์ขนาดต่าง ๆ ซึ่งให้ผลลบต่อปฏิกิริยา PAS

B ลิมโฟไซต์ขนาดกลาง (medium lymphocyte) ให้ผลลบต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ PAS

C อิโอซิโนฟิล (Eosinophil) ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ PAS ติดสีชมพูระหว่างแกรนูลในไซโตปลาสมอย่างชัดเจน

D ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte) ให้ผลลบต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ PAS

E ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte) บางเซลล์จากตัวอย่างเลือดโคนมติดเชื้อ BLV จำนวน 2 / 18 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ PAS มีลักษณะการติดสีเป็นแกรนูลสีชมพูกระจายอยู่ภายในไซโตปลาสม



ภาพที่ 4

คำอธิบายภาพที่ 4

ภาพเม็ดเลือดขาวจากฟิล์มบางของเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (buffy coat smear) ของตัวอย่างเลือดโคนมเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว Acid Posphatase Stain (AcP) ปฏิกิริยาไซโตเคมีให้ผลบวกต่อ AcP จะติดสีน้ำตาล - แดงเข้ม บริเวณข้างนิวเคลียส (paranuclear area) ในไซโตปลาสมของลิมโฟไซต์ โดยลิมโฟไซต์ที่ให้ปฏิกิริยา AcP ชัดเจนเป็นลิมโฟไซต์ชนิด T - cell และให้ผลบวกในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล (granulocyte) โดยเฉพาะนิวโทรฟิลบางระยะ (Bar = 5 μ)

A, B, C ลิมโฟไซต์ขนาดกลาง (medium lymphocyte) ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ AcP ติดสีน้ำตาล - แดงเข้ม บริเวณข้างนิวเคลียส ในรูปแบบต่าง ๆ

D ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte) ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ AcP ชัดเจน

E แกรนูลโลไซต์ (Granulocyte) (ซ้าย) และลิมโฟไซต์ขนาดกลาง (medium lymphocyte) (ขวา) ทั้งสองเซลล์ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ AcP ติดสีน้ำตาล - แดงเข้ม ในไซโตปลาสม

F โมโนไซต์ (Monocyte) ให้ผลลบต่อปฏิกิริยาไซโตเคมีของ AcP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์และสรุปผล

จากสุ่มตัวอย่างเลือดโคนมที่ได้ทำการศึกษาในเกณฑ์อายุ 3 ปี ขึ้นไป โคนมที่ติดเชื้อ Bovine Leukemia Virus (BLV) โดยการให้ผลบวกต่อวิธีทางซีรั่มวิทยา AGID คิดเป็น 22.50 % (18/80) ซึ่งอุบัติการณ์ครั้งนี้ใกล้เคียงกับที่รื่นฤดี และคณะ (พ.ศ. 2537) เคยรายงานมาก่อน การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการตรวจหาโคนมที่ติดเชื้อ BLV โดยวิธี AGID เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง เพื่อหาอุบัติการณ์ของ Enzootic bovine leukosis (Miller, 1980 ; Onuma *et al.*, 1987 ; Straub, 1978) ในการควบคุมและกำจัดโรคนั้นข้อจำกัดของวิธี AGID ยังคงมีอยู่ เช่น การตรวจจะให้ผลบวกในกรณีโคนมติดเชื้อมาระยะหนึ่ง โดยไม่สามารถตรวจในขณะมีการติดเชื้อในช่วงแรกได้ (early infection) (Straub, 1978)

ในจำนวนโคนมที่ทำการศึกษาทั้งสิ้น 80 ตัว ผลทางโลหิตวิทยา ทั้งสองกลุ่มคือ ให้ผลบวก และผลลบต่อ AGID มีการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (persistent lymphocytosis) ในระดับมากกว่า 8,500 เซลล์/ลบ.มม. เมื่อเทียบกับ Bendixen's key (Miller, 1980) ซึ่งถือว่าเป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาว โดยโคนมที่มีจำนวนลิมโฟไซต์สูงในกระแสโลหิตจะมีรอยโรคของก้อนมะเร็งตามอวัยวะต่าง ๆ ด้วย (Blood and Radostits, 1989) ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยไม่สามารถติดตามโคนมที่ให้ผลบวกต่อ AGID ไปถึงโรงฆ่าสัตว์ เพื่อศึกษารอยโรคของก้อนมะเร็งได้ การเลือกกลุ่มโคนมศึกษาโดยสุ่มตัวอย่างโคนมกลุ่มให้ผลบวกต่อ AGID และอาการภายนอก เช่น ซูบผอม น้ำหนักตัวลด การให้นมลด ซึ่งน่าจะบ่งสภาพติดเชื้อ BLV (Blood and Radostits, 1989) โคนมที่ได้จากการศึกษาทั้งหมด ตัวที่ให้ผลบวกต่อวิธีทางซีรั่มวิทยา AGID ติดเชื้อ BLV แบบไม่แสดงอาการต่าง ๆ ให้เห็น หรือเป็นกลุ่ม Enzootic bovine leukosis (leukemia) (EBL) (Bendixen, 1965; Miller, 1980)

การเฝ้าระวังโรคทางประเทศเดนมาร์คแนะนำการตรวจเลือดเพื่อดูค่าการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา อย่างน้อย 3 ครั้ง ในการวินิจฉัยยืนยัน (Miller, 1980) จากการศึกษาพบว่าเมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาของโคนมติดเชื้อ BLV (ผลบวกต่อ AGID) จำนวน 5 ตัว และโคปกติ (กลุ่มที่ให้ผลลบ) 4 ตัว ในระยะเวลา 6 เดือน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ค่าโลหิตวิทยาทั้งสองกลุ่ม โดยเฉพาะจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total leukocyte count) อยู่ในระดับค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับค่าปกติของโค (Blood and Studdert, 1988) อาจเนื่องมาจากเป็นโคที่มีเม็ดเลือดขาวสูงเฉพาะตัว (Typical leukotic cow) (Straub and Lorenz, 1976) พันธุกรรม (Burny *et al.*, 1978) หรืออาจมีภาวะติดเชื้อแบคทีเรีย ปรสิตชนิดอื่น ๆ (Blood and Studdert, 1988) กลุ่มโคนมเป็นโรคให้ผลบวกต่อ AGID เป็นตัวอมโรค โดยไม่แสดงอาการ และแพร่เชื้อไปยังตัวอื่นในฝูงโดยทางแมลงดูดเลือด ซึ่งเป็นพาหะของโรคนี้ (Mohanty and Dutta, 1981)

จากผลการศึกษาฟิล์มเลือดบาง (blood smear) ของเลือดครบ (whole blood) และเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (buffy coat smear) ของโคนมที่เป็นโรค และโคปกติ จำนวนลิมโฟไซต์อยู่ในระดับ มากกว่า 8500

เซลล์/ลบ.มม. ซึ่งค่อนข้างสูง (persistent lymphocytosis) ในโคอายุ 3 ปี เมื่อเทียบกับ Bendixen's key สรุปได้ว่าโคนมที่ศึกษาทั้งสองกลุ่มควรจะเป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาว แต่เมื่อเทียบกับค่าปกติจำนวนเม็ดเลือดของโคนมยังคงอยู่ในช่วงปกติ (Blood and Studdert, 1988) ไม่พบ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอ่อน โดยเฉพาะลิมโฟบลาสท์ในตัวอย่างโคนมเป็นโรค ความสัมพันธ์ของการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว และลิมโฟไซต์กับการพบก้อนมะเร็งตามอวัยวะต่าง ๆ หรือการพบ lymphoblast ในโคนมที่เป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวไม่แน่นอน ดังนั้นโคนมที่ให้ผลบวกต่อ AGID ในการศึกษาครั้งนี้อาจไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาที่อาจตรวจพบได้ (Blood and Radostits, 1989; Miller, 1980) ผลจากการศึกษาทางโลหิตวิทยาของโคนมทั้งสองกลุ่มนี้อาจบ่งชี้ว่าค่าทางโลหิตวิทยาไม่สามารถช่วยในการวินิจฉัยในโคกลุ่มที่ทำการศึกษาครั้งนี้ได้

การศึกษาทางโซโตเคมีจากตัวอย่างเลือดโคนมที่ผล AGID บวก โดยเปรียบเทียบกับโคนมให้ผลลบ การไม่พบ ลิมโฟบลาสท์ หรือ blast cell ของเม็ดเลือด ชนิดต่างๆ ในแผ่นฟิล์มเลือดบางดังกล่าวมาแล้ว ทำให้ผลการศึกษาลักษณะการย้อมทางโซโตเคมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ในโคนมทั้งสองกลุ่ม ดังนั้นผลจากการศึกษาจะรายงานผลปฏิกิริยาทางไซโตเคมี ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ จากฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้น เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาลักษณะเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอ่อน (หรือเซลล์มะเร็ง) ในรายโคนมเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่พบเซลล์มะเร็งในกระแสโลหิตต่อไป เป็นที่ยอมรับกันว่าปฏิกิริยาไซโตเคมีจะช่วยในการวินิจฉัยเซลล์เม็ดเลือดชนิดอ่อน (blast cell) ที่พบอยู่ในกระแสโลหิต เพื่อการวินิจฉัย และจำแนกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในทางการแพทย์ (Bennett and Reed, 1979; Catovsky *et al.*, 1974) โดยร่วมกับการทำเครื่องหมายทางอิมมูน (Immunological markers) บนผิวเซลล์ (Takashima *et al.*, 1980) โรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวในโคนม เซลล์ที่พบว่าปริมาณสูง ได้แก่ ลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็นได้ทั้งชนิด T - cell และ B - cell โดยมีวิวัฒนาการร่วมกับ pre - B - cell คล้ายกับ human "null" Type ใน acute lymphocytic leukemia ในคน (Raich *et al.*, 1983) ในการศึกษาทางไซโตเคมีของโรคความผิดปกติของระบบสร้างเม็ดเลือด (Hemopoietic disorders) รูปแบบการติดสีของเซลล์ปกติในระบบหมุนเวียนจะมีส่วนสำคัญในการอธิบายพยาธิสภาพต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น (Raich *et al.*, 1983; Yam *et al.*, 1971) โดยการศึกษาทางไซโตเคมีจะช่วยในการอธิบายต้นกำเนิดของเซลล์มะเร็ง (neoplastic cell) จากเซลล์อ่อน (blast cells) ที่ปรากฏอยู่ในกระแสโลหิตของสัตว์ป่วยจากผลการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากผลทางเซลล์วิทยาของฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้นของโคนมที่เป็นโรค BLV ไม่พบเซลล์อ่อน ทำให้ผลการศึกษาทางไซโตเคมีของเม็ดเลือดจากโคนมทั้งสองกลุ่มเป็นลักษณะเซลล์เม็ดเลือดขาวโตเต็มที่ (mature leukocyte) ซึ่งจากรายงานของ Raich และคณะ (1983) พบว่าโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวของโคนมแบบ Adult ซึ่งมักพบในโคนมอายุมากกว่า 3 ปี ปฏิกิริยาทางไซโตเคมีจะคล้ายคลึงกับเซลล์เม็ดเลือดขาวสภาพปกติในกระแสโลหิตตามสายวิวัฒนาการของเซลล์ จึงทำให้ผลการศึกษาครั้งนี้แบบการติดสี (staining pattern) ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ที่พบในโคทั้งสองกลุ่มคล้ายคลึงกัน

ปฏิกิริยาไซโตเคมีของ Sudan Black B (SBB) จะย้อมติดไขมัน (lipid) รวมทั้ง neutral fat และ phospholipid (Tricot *et al.*, 1982) โดยได้ผลบวกอย่างชัดเจนในเซลล์ myeloid granulocyte หรือ ปฏิกิริยาmyoloperoxidase - positive ของเซลล์อ่อน SBB จะใช้ในการวินิจฉัย Acute Myeloid Leukemia ในคน (Bennett and Reed, 1979) ในการศึกษาครั้งนี้ปฏิกิริยาไซโตเคมีของ SBB จะให้ผลบวกจำเพาะแกรนูล (granule) ใน cytoplasm ของเม็ดเลือดขาวโตเต็มที่ (mature) ชนิด แกรนูโลไซต์ granulocyte ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไซโตเคมีของกลุ่มแกรนูโลไซต์ ในกระแสโลหิตในสภาพปกติ ส่วนในกรณีการจำแนกประเภทและศึกษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนม และแกะ SBB จะเป็นตัวชี้ในการจำแนกประเภทได้อย่างชัดเจน โดยมักจะให้ผลลบ ในเบื้องต้นเนื่องจากเซลล์มะเร็งในโรคนี้มักจะมีต้นกำเนิดจากลิมโฟไซต์ จากการศึกษาที่รายงานมาก่อน (Raich *et al.*, 1983)

ปฏิกิริยาไซโตเคมีของ Periodic Acid Schiff (PAS) จะให้ผลบวกกับคาร์โบไฮเดรทพวก polysaccharides และ mucosubstance ในทางไซโตเคมีจะใช้เพื่อบ่งชี้ปริมาณ Cytoplasmic glycogen ในกลุ่มเซลล์ ชนิด diastase - sensitive (Catovsky *et al.*, 1974) ให้แบบการติดสีบริเวณระหว่างแกรนูล (intergranular space) เช่น ในแกรนูโลไซท์ อิโอซิโนฟิล เบโซฟิล นิวโทรฟิล และคล้ายแกรนูลสีชมพูรอบนิวเคลียสในลิมโฟบลาสท์ (Hayhao and Quaglino, 1988) ซึ่งมีเคยรายงานในรายเซลล์มะเร็งลิมโฟไซต์ให้ผลบวกต่อ PAS ใน B - cell lymphoma ในคน (Stein *et al.*, 1983) รวมทั้งลิมโฟไซต์ที่พบมากขึ้นในกระแสโลหิตราย chronic lymphocytic leukemia ในคน (Hayhao and Quaglino, 1988) ผลการศึกษา PAS ในฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้นของโคนมทั้งสองกลุ่ม พบว่าในกลุ่มโคนมที่เป็นโรคพบปริมาณลิมโฟไซต์อยู่ในเกณฑ์ปกติ เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐาน (Blood and Studdert , 1988) ปฏิกิริยา PAS ในตัวอย่างเลือดโคนมกลุ่มเป็นโรค ในบางตัวอย่างเลือด (2 ใน 18 ตัวอย่าง) จะพบปฏิกิริยา PAS เป็นบวกมีลักษณะคล้ายแกรนูลสีชมพูเป็นวงรอบนิวเคลียสในลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte, prolymphocyte) (Sanderson and Phillips, 1981) บางเซลล์ ซึ่งน่าจะบ่งถึงลักษณะของ ลิมโฟบลาสท์ ที่ปรากฏอยู่บ้าง ในกระแสโลหิต (Catovsky *et al.*, 1974) ในขณะที่โคนมปกติ ไม่พบปฏิกิริยา PAS ในเม็ดลิมโฟไซต์ ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้อาจมีส่วนสัมพันธ์คล้ายกับภาวะ leukemia ในระยะเรื้อรัง (chronic) ในคน ซึ่งพบจำนวนลิมโฟไซต์ชนิดให้ผลบวกกับ PAS มากขึ้นในกระแสโลหิต (Hayhao and Quaglino, 1988, Stein *et al.*, 1983) ส่วนปฏิกิริยา PAS ในช่องว่างระหว่างแกรนูล (intergranular space) ของเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล เช่น นิวโทรฟิล อิโอซิโนฟิล และเบโซฟิล พบได้ในทั้งสองกลุ่ม เนื่องจากในเม็ดเลือดขาวเหล่านั้นจะพบไกลโคเจนในไซโตปลาสมที่ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยา PAS โดยเฉพาะใน นิวโทรฟิล จะเด่นชัดมาก (Hayhao and Quaglino, 1988)

ปฏิกิริยาไซโตเคมีของ Acid Phosphatase (AcP) เป็นเอนไซม์ของไลโซโซม (lysosomal enzyme) ในกลุ่ม acid hydrolase เช่น Acid Phosphatase (AcP), α - naphthyl acetate esterase (ANAE), B - glucuronidase (BG) และ N - acetyl - B - glucosaminidase (NABG) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ลิมโฟไซต์ (lymphocyte markers) (Crockard *et al.*, 1982) นอกจากนี้ยังให้ผลบวกในนิวโทรฟิลชนิดปฐมภูมิ (primary

neutrophil) และ เซลล์เม็ดเลือดแดงชนิดอ่อน (erythroblast) (Hayhao and Quaglino, 1988) ผลบวกของปฏิกิริยา AcP จะเด่นชัดบริเวณส่วน Golgi ในไซโตปลาสมของลิมโฟไซต์ บริเวณรอบนิวเคลียส (paranuclear zone) โดยขึ้นอยู่กับวิวัฒนาการของเซลล์ (differentiation) ซึ่ง AcP ให้ผลบวกเป็นปริมาณสูงใน T - cell group I (phenotype I) เป็นลักษณะเซลล์ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature) (Basso *et al.*, 1980) ปฏิกิริยาไซโตเคมี AcP ในเซลล์มะเร็งจะบ่งถึงมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T - acute lymphocytic leukemia (T - All) (Head *et al.*, 1986) ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค ปฏิกิริยา AcP จะพบได้ทั้งลักษณะ T และ B cell ในเซลล์มะเร็ง โดยปฏิกิริยาของ AcP ใน T - cell จะเด่นชัดกว่า B - cell (Raich *et al.*, 1983) มีรายงานว่าปฏิกิริยาของ AcP จะลดลงในลิมโฟไซต์ราย chronic lymphocytic leukemia ในคน (Catovsky *et al.*, 1974) ในการศึกษาครั้งนี้ปฏิกิริยาไซโตเคมีของ AcP จะพบในลิมโฟไซต์ในกระแสโลหิตของในโคนมทั้งกลุ่มที่เป็นโรค และปกติ โดยแบบการติดสีคล้ายคลึงกัน ไม่พบ lymphoblast หรือเซลล์มะเร็งในที่ฟิล์มเลือดบาง ดังนั้นลิมโฟไซต์ที่พบจะเป็นลิมโฟไซต์ที่พบในกระแสโลหิต ซึ่งอาจเป็นระยะต่าง ๆ ตามการวิวัฒนาการของเซลล์ แต่สามารถบ่งชี้ว่าปฏิกิริยาของ AcP ชัดเจนจะพบในเซลล์กลุ่ม T - cell (Raich et. al., 1983) และหากเปรียบเทียบปฏิกิริยาของอีกทางหนึ่ง ลิมโฟไซต์ที่ให้ปฏิกิริยา AcP ชัดเจนมากจะอยู่ในกลุ่ม T - cell group I (phenotype I) ซึ่งเป็นกลุ่มที่เซลล์ยังไม่วิวัฒนาการเต็มที่ (Basso et. al., 1980) ซึ่งในการศึกษาเพื่อดูลักษณะและปริมาณความชัดเจนของปฏิกิริยาAcP ในลิมโฟไซต์อาจแสดงปริมาณลิมโฟไซต์ที่ค่อนข้างอ่อนในกระแสโลหิต ซึ่งจะช่วยในการวินิจฉัยโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวได้ นอกจากนี้ควรเลือกเอนไซม์ในกลุ่ม acid hydrolase ตัวอื่น เช่น NABG หรือ ANAE ซึ่งจะบ่งถึงลิมโฟไซต์เจริญเต็มที่ (phenotype IV) ในตัวอย่างเลือดได้ (Basso *et al.*, 1980) ลักษณะลิมโฟไซต์ที่พบในกระแสโลหิตในโคและกระบือจะมี 3 ประเภท คือ ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (large lymphocyte) หรือ prolymphocyte เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 - 15 μm ลิมโฟไซต์ขนาดกลาง (medium lymphocyte) เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 - 12 μm และลิมโฟไซต์ขนาดเล็ก (small lymphocyte) เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 - 10 μm (Sanderson and Phillips, 1981) จากผลการศึกษาลิมโฟไซต์ทั้ง 3 ลักษณะนี้ ให้ปฏิกิริยาของ AcP ในรูปแบบเดียวกัน ดังนั้นปฏิกิริยาของ AcP ต่อลิมโฟไซต์ในกระแสโลหิตของโคทั้งสองกลุ่มไม่สามารถบอกสภาพการติดเชื้อ หรือจำแนกประเภทได้หากไม่พบเซลล์อ่อน (blast cell) ในกระแสโลหิต เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบระดับของปฏิกิริยา AcP ในลิมโฟไซต์แล้ว ปฏิกิริยาที่ชัดเจน จะเป็น T - cell ใน phenotype I หากปฏิกิริยาอ่อนๆ หรือปานกลาง จะเป็น T - cell ที่เป็น phenotype อื่นๆ เช่น phenotype III หรือ IV หรืออาจเป็น B - cell หรือ non - T - lymphoblast ก็ได้ (Basso *et al.*, 1980) และควรใช้การทดสอบวิธีอื่นประกอบด้วย เช่น rosette formation โดยรอบของเซลล์ของเม็ดเลือดแดงของแกะ (sheep red blood cell , SRBC) ในราย T - cell leukemia (Wehinger and Möbius, 1976) หรือปฏิกิริยา Phytohaemagglutinin (PHA) โดยวิธีเพาะเลี้ยงลิมโฟไซต์ในราย chronic lymphocytic leukemia (Catovsky *et al.*, 1974)

ผลจากการศึกษาปฏิกิริยาไซโตเคมีของเม็ดเลือดขาวจากโคนมติดเชื้อ BLV โดยได้ผลบวกต่อการตรวจทางซีรั่มวิทยา AGID รูปแบบการติดสีในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ในกระแสโลหิต ซึ่งหากโคนม

ติดเชื้อเป็นชนิดไม่พบเซลล์มะเร็งอยู่ในกระแสโลหิต (Aleukemic leukemia) จะเป็นการยากที่จะตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้ เนื่องจากฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้นจะไม่ปรากฏเซลล์มะเร็งหรือเซลล์อ่อน รวมทั้งจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total leukocyte count) ทางโลหิตวิทยาจะไม่สามารถบ่งบอกสภาพการเป็นโรคได้ นอกจากนี้โคนมกลุ่มที่ได้สุ่มตัวอย่างศึกษาอาจอยู่ในภาวะการติดเชื้อแบบ Adult หรือ Enzootic form โดยจะพบว่าเพียง 1/3 หรือ 1/4 ของโคนมที่เป็นโรคจะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูง และพบเซลล์มะเร็งในกระแสโลหิต (Ferrer *et al.*, 1981) และไม่แสดงอาการเด่นชัด แต่หากได้ติดตามจนถึงโรงฆ่าสัตว์ ควรจะพบว่าโคนมที่ตรวจว่ามีการติดเชื้อ BLV มีรอยโรคตามอวัยวะภายในต่าง ๆ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ผู้ศึกษาไม่ได้ติดตามจนถึงโรงฆ่าสัตว์ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาทางไซโตเคมีของเม็ดเลือดขาวในโคนมติดเชื้อ BLV และโคนมปกติครั้งนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาโรค และความผิดปกติของระบบสร้างเลือด (Hemopoietic system) และน้ำเหลือง (lymphoproliferative disorders) ในสัตว์ รวมทั้งการพัฒนาห้องปฏิบัติการทางไซโตเคมีขึ้นเพื่องานศึกษาวิจัย และบริการเซลล์วิทยาทางสัตวแพทย์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทสรุป

ข้อสรุปจากงานวิจัยนี้ ได้แก่

1. การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาของโคนมติดเชื้อ BLV และโคนมกลุ่มปกติ ในระยะเวลา 6 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ และผลทางซีรั่มวิทยายังคงให้ผลบวกอย่างต่อเนื่อง ในระยะเวลาตรวจซ้ำทุก 3 เดือน เพื่อประโยชน์ในการวางแผนกำหนดระยะเวลาการตรวจ และสุ่มตัวอย่าง เพื่อการควบคุมโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนมอย่างมีประสิทธิภาพ

2. โคนมกลุ่มที่ศึกษาเป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวชนิด Adult form หรือ Enzootic bovine leukosis (EBL) ซึ่งพบมากในโคนม

3. การตรวจแผ่นฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้น ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวในโคนมในกลุ่มที่ศึกษา หรือกลุ่มโคนมเป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาวชนิด Enzootic bovine leukosis (EBL)

4. การชันสูตรโดยใช้ปฏิกิริยาทางไซโตเคมีของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโคนมจากแผ่นฟิล์มเลือดบาง และเม็ดเลือดขาวแยกชั้น ไม่เหมาะสมในการตรวจโคนมติดเชื้อแบบ Adult หรือ EBL โดยเสนอแนะควรเก็บตัวอย่างจากการกดละเลง (impression smear) เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง หรืออวัยวะภายในต่าง ๆ ที่ตรวจพบก้อนเนื้องอก และศึกษาทางไซโตเคมีเซลล์เหล่านั้นจะเหมาะสมกว่า

5. รูปแบบการติดสีทางไซโตเคมีของ Sudan Black B (SBB), Periodic Acid Schiff (PAS) และ Acid Phosphatase (AcP) ได้นำมาศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเป็นสีที่ใช้ในทางปฏิบัติในการจำแนกโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) ในคน โดยเฉพาะระหว่างเม็ดเลือดขาว Myeloblost ชนิดมีแกรนูล และลิมโฟไซต์ ซึ่งจะทำให้ทราบว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดใด ปฏิกิริยาไซโตเคมีดังกล่าวนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดขาวในโคนม ได้ทั้งรูปแบบการติดสี ความเข้ม และความจำเพาะ

6. ผลการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลพื้นฐานของปฏิกิริยาไซโตเคมีของเม็ดเลือดขาวในโคนม ซึ่งอาจนำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาต่อไซโตเคมีเหมาะสมเซลล์มะเร็งของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในทางพยาธิวิทยาคลินิค เพื่องานวิจัย และพัฒนาทางเซลล์วิทยาสัตวแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ

- เงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2537 ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- สัตวแพทย์หญิง รื่นฤดี บุณยะโหตระ กลุ่มงานไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์ บางเขน. ให้ความอนุเคราะห์ในการวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยาจากเลือดโคนม
- นายสัตวแพทย์ อดิเทพ เฉลิมฉัตร และนายสัตวแพทย์วีรศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา นายสัตวแพทย์ประจำองค์การส่งเสริมโคนมแห่งประเทศไทย อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บเลือดตัวอย่างโคนมในการศึกษา
- อาจารย์ นายสัตวแพทย์ คมกฤช เทียนคำ หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเก็บตัวอย่าง และทางห้องปฏิบัติการ
- คุณอมรรัตน์ ทัศนกิจ นักวิทยาศาสตร์ หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- คุณศิลป์ชัย เพียรชอบ และคุณวิฑูรย์ มะบุตร เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความอนุเคราะห์ด้านเทคนิคไซโตเคมีจากตัวอย่างเลือดทางห้องปฏิบัติการ
- หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เอื้อเฟื้อกล้องถ่ายภาพทางจุลพยาธิวิทยาในการถ่ายภาพเม็ดเลือดตัวอย่าง
- นายสัตวแพทย์พูนสิน เหล่ามหาเมฆ บริษัทโนวาร์ตีส (ประเทศไทย) จำกัด อนุเคราะห์ในด้านการพิมพ์เพลทภาพ
- คุณณาฐวลัย สงวนเผ่า อนุเคราะห์ในด้านการจัดพิมพ์รายงานฉบับสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ชัยวัธน์ วิทูระกูล, เพ็ญศรี ธีระวัฒน์, ประสบพร ทองนุ่น, ปกรณ์ สุวรรณประภา, พัชรา วิทูระกูล. (2537) การสำรวจสภาวะโรคโคนมในภาคเหนือ, รายงานผลการสำรวจสภาวะโรคโคนมปี 2537. สถาบันสุขภาพสัตว์, กรมปศุสัตว์. น. 138 - 147.

พุทธชาด ศรีโสภา, อุษา นาคสกุล และสมใจ ศรีหาคิม. (2537) การสำรวจโรค Enzootic Bovine Leukosis และ Infections Bovine Rhinotracheitis ทางซีรั่มวิทยาในโคนมของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. รายงานผลการสำรวจสภาวะโรคโคนมปี 2537. สถาบันสุขภาพสัตว์, กรมปศุสัตว์. น. 100 - 107.

ยรรยง อินทรรักษา, ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ, วรศักดิ์ ปัจฉิมะศิริ, พิภพ จาริกภากร และโชคชัย ชัยมงคล. (2528) โรคลูคิเมียในโคนม. สัตวแพทยสาร 36(1) : 9 - 23.

รื่นฤดี บุญยะโหตระ, อารี ทรัพย์เจริญ, ธิดา ศิริวรรณ์ และอุราศรี ตันตสวัสดิ์ (2537) ความชุกของโรคการติดเชื้อ Bovine Leukemia virus ในโคนมในภาคกลางของประเทศไทย. เวชชสารสัตวแพทย์ 24 (3) : 40 - 216.

ศรีประภา ชินประเสริฐศักดิ์ และอนงค์ เพียรกิจการ (2534) ถาม - ตอบทางเซลล์เคมีเม็ดเลือด. สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 94 น.

Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzutto, A and Zanesco, L. 1980. Cytochemical Study of Thymocytes and T Lymphocytes. British Journal of Haematology 44 : 577 - 582.

Bendixen, H. J. 1965. Bovine enzootic Leukosis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 10 : 129 - 204.

Bennett, J. M. and Reed, C. E. 1979. Cytochemistry of the leukemic cell. In : The Leukemic cell. Rubin A. D. and Waxmans I. (eds.) p. 7 - 23.

Benton, C. V., Soria, A. E. and Gilden, R. V. 1978. Direct syncytial assay for the quantitation of bovine Leukemia virus. Infect Immun. 20 : 307 - 309.

Bex, E., Bruck, O. and Mammerickx, M. 1979. Humoral antibody response to bovine leukemia virus infection in cattle and sheep. Cancer Res. 39 : 1118 - 1123.

Blood, D. C. and Radostits, O. M. 1989. Bovine viral leukemia. In : Veterinary Medicine 7 th. Bailliere Tindall, Toronto. p. 816 - 823.

Blood, D. C., Radostits, O. M. and Henderson, J. A. 1984. Bovine viral leukemia. In : Veterinary Medicine 6 th. Bailliere Tindall, London. p. 725 - 733.

Blood, D.C., Studdert, V.P.1988. Baillière's Comprehensive Veterinary Dictionary. Baillière Tindall, W.B. Saunders. 1st Edition. p. 1004 - 1005

Burny, A., Bex, F., Chantrenne, H. 1978. Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. Adv. Cancer. Res. 28 : 251 - 311.

Catovsky, D., Galletto, J., Okos, A., Milliani, E. and Galton, D. A. G. 1974. Cytochemical profile of B and T leukemia lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukemia. J. Clin. Pathology. 27 : 767 - 771.

Crockard, A., Chalmers, D., Matutes, E. and Catovsky, D. 1982. Cytochemistry of acid hydrolases in chronic B - and T- cell Leukemias. Am. J. Clin. Pathol. 78 (4) : 437 - 444.

Ferrer, J. F., Kenyon, J. S. and Gupta, P. 1981. Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. Science 213 (28) : 1014 - 1016.

Goldberg, A. F. and Burka, T. 1962. Acid phophatase activity in human blood cells. Nature 195 : 195 - 297.

Hayhoe, F. G. J. and Quaglino, D. 1988. Hematological Cytochemistry. Churchill Livingstone, Edinburgh. 2nd Edition : pp. 67 - 85, 86 - 110, 124 - 174.

Head, D. R., Borowitz, M., Cerezo, L. et al. 1986. Acid phosphatase positivity in childhood acute lymphocytic leukemia. Am. J. Clin. Pathol. 86 (5) : 650 - 653.

House, J. A., Glover, F. L. and House C. 1975. Current aspects of bovine leukemia. Reprint from Proc. Eight Ann. Conference.

Masangkey, J. S. and Lieberman, D. 1982. A Serological survey for the presence of bovine Leukosis (lymphosarcoma) in Central Luzon, Philippines. The Philippines J. of Vet. Med. 38 : 92 - 101.

Miller, L. D. 1980. Export testing for enzootic bovine leukosis. JAVMA. 177 : 620 - 622.

Miller, J. and Schmerr, M. J. F. 1987. Detection of Bovine Leukemia virus infection by Immunodiffusion and radioimmunoassay. In : Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia virus. Burny A. and Mammerickx (eds.) Martinus Nijhoff Publishing, baston. P. 187 - 193.

Mohanty, S. B. and Dutta, S. K. 1981. Veterinary Virology. Lea Febiger, Philadelphia. p. 318 - 322.

Onuma, M., Hohma, T. and Mikami, T. 1978. Survey of antibodies of bovine leukemia virus in dairy and beef Cattle in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 40 : 191 - 196.

Portetelle, D. and Mammerickx, M. 1987. ELISA, A highly sensitive and specific method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. In : Development in Veterinary Virology : Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. Burny A. and Mammerickx M. (eds.)

Martinus Nijhoff Publishing, Boston. P. 201 - 217.

Portetelle, D., Bruck, C., Mammerickx, M. and Burny, A. 1980. Bovine Leukemia virus. Virology. 105 : 223.

Raich, P. C. Takashima, I. and Olson, C. 1983. Cytochemical Reaction in Bovine and Ovine Lymphosarcoma. Vet. Pathol. 20 : 322 - 329.

Sanderson, J. H. and Phillips, C. E. 1981. An Atlas of Laboratory Animal Haematology. Clarendon Press. Oxford. p. 388 - 431.

Stein, P., Peiper, S., Butler, D., Melvin, S., Wiliams, D. and Stass, S. 1983. Granular Acute Lymphoblastic Leukemia. Am J. Clin. Pathol. 79 : 426 - 430.

Straub O. C. 1978. Diagnosis of enzootic bovine leukosis : a comparison of haematological and immunodiftusion test. Research in Veterinary Science. 25 : 13 - 15.

Straub, O. C. and Lorenz, R. J. 1976. Virology diagnostic procedures epizootiology and transmission of bovine leucosis. Vet. Microbiol. 1 : 93 - 111.

Takashima, I., Olson, C., Driscoll, D. M. and Baugarther, L. E. 1980. Bovine Leukosis in sheep lymphocyte modification and surface - immunoglobulin bearing cell numbers. Vet Microbiol, 5 : 1 - 12.

Thompson, S. W. and Hunt R. D. 1966. Selected histochemical and histopathological method. Springfield Thomas. p. 210 - 320.

Thurmond, M. C. and Burridge, M. J. 1982. Application of research to control of bovine leukemia virus infection and to exportation of bovine leukemia virus - free cattle and seman. Jounnal of the American Veterinary Medical Association. 181 : 1531 - 1534.

Tricot, G., Orshoven, B - V., Vanttoof, A. and Verwilghen, R. L. 1982. Sudan Black B positivity in acute lymphoblastic Leukemia. British Journal of Haematology. 51 : 615 - 621.

Wehinqer, H. and Möbius, W. 1976. Cytochemical Studies on T and B lymphocytes and lymphoblasts with special reference to acid phosphatase. Acta haemato. 56 : 126 - 136.

Yam, L. T., Li, C. Y. and Crosby, W. H. 1971. Cytochemical Identification of Monocytes and Granulocytes. Am. J. Clin. Pathol.. 55 : 283 - 290.