

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวโดยกล้องจุลทรรศน์

และ CellaVision DM96

พรวิทย์ ลำเจียกเทศ¹ จิรศักดิ์ ปฐมวัฒนานุรักษ์² ขนิษฐา หงวนดัด² อุไรวรรณ แก้วบวร²
และ นฤมล โชคคุณะวัฒนา³

¹ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ²แผนกโลหิตวิทยา กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า,

³บริษัทพีซีแอล โฮลดิ้ง จำกัด กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวเป็นส่วนหนึ่งของ complete blood count (CBC) ซึ่งมีความสำคัญในการประกอบการวินิจฉัย และการดูแลรักษาผู้ป่วย การตรวจสเมียร์เลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และต้องการผู้ปฏิบัติงานที่มีประสบการณ์สูง CellaVision DM96 เป็นเครื่องอัตโนมัติที่มีระบบวิเคราะห์ภาพเซลล์จากสเมียร์เลือด โดยเครื่องอัตโนมัติจะกำหนดตำแหน่งและถ่ายภาพเม็ดเลือดขาวแล้วนำไปวิเคราะห์โดย artificial neural network ซึ่งมีฐานข้อมูลของเซลล์และทำการจำแนกเม็ดเลือดขาวตามชนิดภาพของเซลล์จะแสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์เพื่อให้ผู้ทำการยืนยันหรือจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาวใหม่ **วัตถุประสงค์** เพื่อประเมินการนับเม็ดเลือดขาวโดยใช้เครื่อง CellaVision DM96 และ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์ **วัสดุและวิธีการ** ตัวอย่างเลือดเก็บในสารกันเลือดแข็ง tripotassium-ethylenediaminetetra-acetic acid (K_3 -EDTA) ของผู้ที่มีค่า CBC อยู่ในช่วงค่าอ้างอิง 100 ราย (ชาย 61 คน หญิง 39 คน) ซึ่งเหลือจากการตรวจ CBC ในงานประจำวันของห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวถูกวิเคราะห์โดยเครื่อง CellaVision DM96 และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์ **ผลการศึกษา** ช่วงพิสัยร้อยละ 95 ของการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว หลังจากแก้ไขการจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาวของเครื่อง CellaVision DM96 มีค่าใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของการจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาวของเครื่อง CellaVision DM96 และค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานคือ 0.83 (นิวโตรฟิล) 0.86 (ลิมโฟไซต์) 0.45 (โมโนไซต์) 0.54 (อีโอสิโนฟิล) และ 0.30 (เบโซฟิล) **สรุป** จากข้อมูลเบื้องต้น ผลของเครื่อง CellaVision DM 96 มีความใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน และสามารถลดภาระงานการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวในสเมียร์เลือดปกติได้ สำหรับการนำไปใช้ในทางคลินิกจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมจากตัวอย่างเลือดที่มีความผิดปกติ

Key Words : ● การวิเคราะห์ภาพอัตโนมัติ ● การใช้กล้องจุลทรรศน์ ● การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2556;23:23-32.

บทนำ

การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวจากสเมียร์เลือดโดยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีความสำคัญในการวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรคทางโลหิตวิทยา เนื่องจากสามารถตรวจดูความผิดปกติของปริมาณและรูปร่างเม็ดเลือดซึ่งเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติทางโลหิตวิทยาไม่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง เช่น เซลล์ตัวอ่อนของเม็ดเลือดระยะต่าง ๆ atypical lymphocytes และ neutrophil with toxic granules เป็นต้น

อย่างไรก็ตามวิธีการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวเพียง 100 เซลล์เป็นวิธีที่ใช้เวลา ขาดความแม่นยำ มีความแตกต่างกันระหว่างบุคคลในการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว รวมถึงการรายงานลักษณะเซลล์เม็ดเลือดและต้องการผู้ที่มีประสบการณ์¹⁻⁴ ปัจจุบันได้มีผู้ผลิตเครื่องอัตโนมัติที่ใช้หลักการคล้ายกับการตรวจดูสเมียร์เลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสามารถนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวรายงานรูปร่างเม็ดเลือดแดงและปริมาณเกล็ดเลือดเบื้องต้น (pre-classification) ตัวอย่างเช่น เครื่อง CellaVision DM96 (CellaVision, Lund, Sweden) เครื่องนี้ประกอบด้วย slide scanning unit ซึ่งส่วนประกอบหลัก ได้แก่ motorized microscope และ กล้องถ่ายภาพสีดิจิทัล (digital color camera) ถ่ายภาพเซลล์เม็ดเลือดบนสเมียร์เลือดแล้วนำมาวิเคราะห์โดยใช้ artificial neural network

ได้รับต้นฉบับ 21 ตุลาคม 2555 รับลงตีพิมพ์ 8 กุมภาพันธ์ 2556

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ พรวิทย์ ลำเจียกเทศ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

E-mail: pornvaree.lam@mahidol.ac.th

และโปรแกรม CellaVision blood differential software หลังจากนั้นจะรายงานผลเบื้องต้น⁵ การศึกษาของ Kratz และคณะ⁶ และ Ceelie และคณะ⁷ พบว่าการรายงานการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวแบบ pre-classification ของเครื่อง CellaVision DM96 มีความถูกต้องร้อยละ 82 และ 92 ตามลำดับ และมีความสัมพันธ์กันดีกับวิธีนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวมาตรฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ข้อดีของเครื่องนี้ คือสามารถเรียกภาพเซลล์ที่เก็บไว้มาดูและแก้ไขการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (post-classification) ได้ นอกจากนี้ช่วยลดภาระงานในการตรวจสอบเม็ดเลือดที่ไม่มี ความผิดปกติทางด้านพยาธิวิทยา (non-pathological blood smear)^{6,7} อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่ต้องตรวจซ้ำเมื่อพบเซลล์ที่ผิดปกติ เช่น เซลล์ตัวอ่อนของเม็ดเลือดระยะต่างๆ และเซลล์ที่มีความผิดปกติทางด้านรูปร่างอื่นๆ การนำเครื่องอัตโนมัติดังกล่าวมาใช้งานในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีการศึกษาประเมินก่อนการใช้งาน การศึกษาครั้งนี้เป็นการประเมินเครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 เบื้องต้น โดยศึกษาการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่มผู้ที่มีค่า CBC อยู่ในช่วงค่าอ้างอิง และศึกษาความสัมพันธ์ของการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาววิธีดังกล่าวกับเครื่องอัตโนมัติ Coulter LH780 (Beckman Coulter, USA)

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างตรวจ

เลือดซึ่งเจาะจากหลอดเลือดดำ 2.5 มล. ใส่ในสารกันเลือดแข็ง K₃EDTA (Griener Bio-one GmbH, Austria) ของผู้ที่มาตรวจสุขภาพประจำปี ของห้องปฏิบัติการตรวจทางโลหิตวิทยา โรง

พยาบาลพระมงกุฎเกล้า โดยเลือกกลุ่มผู้ที่มีค่า CBC อยู่ในช่วงค่าอ้างอิง⁸ หลังจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Beckman Coulter LH780 (Beckman Coulter, USA) จำนวน 100 ราย (เพศชาย 61 คน เพศหญิง 39 คน) อายุเฉลี่ย 41 ± 15 ปี ในช่วงระยะเวลา ระหว่างเดือน พฤษภาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2554

วิธีการ

การทำสเมียร์เลือด ย้อมสีและนับแยกเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์

ทำสเมียร์เลือดและย้อมด้วยสี Wright⁹ จำนวน 3 แผ่น ต่อตัวอย่างตรวจ 1 ตัวอย่าง การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์วิธีอ้างอิงทำโดยให้นักเทคนิคการแพทย์ 2 คนนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวคนละ 200 เซลล์ต่อแผ่น รวมนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 400 เซลล์ ต่อ 1 ราย และหาค่าเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ¹⁰ สำหรับสเมียร์เลือดแผ่นที่ 3 ใช้เป็นแผ่นสำรอง

การนับแยกเม็ดเลือดขาวโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96

บรรจุสเมียร์เลือดที่ติดบาร์โค้ดลงในเครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 เครื่องจะทำการสแกน กำหนดตำแหน่งเม็ดเลือดขาว และถ่ายภาพ หลังจากนั้นจะวิเคราะห์ภาพเซลล์โดยใช้โปรแกรม artificial neural network จำแนกชนิดเซลล์เบื้องต้น (pre-classification) และแสดงผลบนจอภาพ (Figure 1) ผู้ใช้งานสามารถเรียกภาพเซลล์แต่ละชนิดที่เก็บไว้ขึ้นมาดูและแก้ไขการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (post-classification) ก่อนที่จะออกรายงานผล⁵ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะนำสเมียร์เลือด 2 แผ่น ของตัวอย่างเลือดแต่ละรายมาวิเคราะห์ pre-classification โดยเครื่องอัตโนมัติแผ่นละ 120 เซลล์และกำหนดให้รายงานผลเป็นค่าร้อยละ หลังจากนั้น นักเทคนิคการแพทย์ 2 คนทำการตรวจภาพที่เครื่องเก็บไว้ซ้ำและ

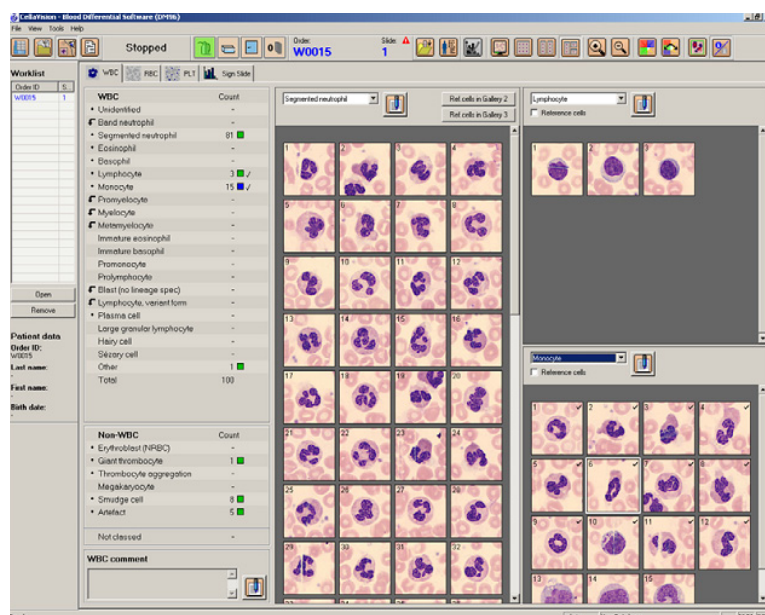


Figure 1 An example of pre-classified leukocytes presented on the computer screen of CellaVisionDM96⁵

แก้ไขก่อนรายงานผลเป็นค่าร้อยละ และคำนวณหาค่าเฉลี่ยของทั้งสองแผนคิดเป็นร้อยละ เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยที่ได้จากวิธีนับแยกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ PASW Statistics 18 ในการคำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ถ้าข้อมูลมีการกระจายแบบโค้งปกติจะใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของหลายประชากร (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบเชิงซ้อนโดยใช้ Least-significant different (LSD) แต่ถ้าข้อมูลมีการกระจายไม่เป็นโค้งปกติจะใช้ Friedman test นอกจากนี้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) รวมถึงความแตกต่างเปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธี ด้วยวิธี Bland-Altman analysis โดยใช้โปรแกรม MedCalc (MedCalc, Mariakerke, Belgium) ค่า $p < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

ค่าเฉลี่ย CBC ของกลุ่มตัวอย่างแสดงใน Table 1 ค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวโดยวิธีใช้เครื่องอัตโนมัติ Coulter LH780 วิธีนับแยกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์และเครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 แสดงใน Table 2 พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของนิวโทรฟิลและโมโนไซต์จากเครื่องอัตโนมัติ Coulter LH780 สูงกว่าค่าเฉลี่ยที่

ได้จากการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวจากสเมียร์เลือดวิธีอ้างอิงและค่าเฉลี่ยที่ได้จากวิธีใช้เครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 ทั้งใน pre-classification ($p < 0.001$) และ post-classification ($p < 0.001$) ส่วนค่าเฉลี่ยร้อยละของลิมโฟไซต์จากเครื่องอัตโนมัติ Coulter LH780 ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวจากสเมียร์เลือดทุกวิธี ($p < 0.001$) ค่าร้อยละของอีโอสิโนฟิลและเบโซฟิล ในแต่ละวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับนิวโทรฟิลระยะ band form ในแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เนื่องจากเครื่องอัตโนมัติ Coulter LH780 ไม่สามารถรายงาน เม็ดเลือดขาวชนิดดังกล่าว ค่าเฉลี่ยเป็นร้อยละของจำนวนนิวโทรฟิลระยะ band form โดยเครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 ใน pre-classification สูงกว่า post-classification และค่าเฉลี่ยของวิธีนับแยกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ($p < 0.001$) ค่าการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและลิมโฟไซต์ในแต่ละวิธีมีความสัมพันธ์กันค่อนข้างดี ($r = 0.7-0.9$) แต่เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) จะมีความสัมพันธ์ปานกลาง ซึ่งจะเห็นได้จากช่วงค่าตัวเลखระหว่าง lower limit และ upper limit ของค่าเฉลี่ย bias มีช่วงกว้างแสดงใน Table 3 สำหรับเม็ดเลือดขาวที่มีจำนวนน้อยค่าความสัมพันธ์จะอยู่ในระดับปานกลางจนถึงต่ำ (Table 3 และ Figure 2-6) ความถูกต้องของการจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาว pre-classification โดยภาพรวมของเครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 คำนวณจาก

Table 1 Hematologic data of 100 subjects by Coulter LH780

Parameters	Subjects	
	Males (n = 61)	Females (n = 39)
RBC count ($\times 10^{12}/L$)	5.0 ± 0.3	4.4 ± 0.4
Hemoglobin (g/dL)	15.1 ± 0.7	13.2 ± 1.1
Hematocrit (%)	44.1 ± 2.3	39.2 ± 2.8
MCV (fL)	88.3 ± 4.0	89.4 ± 4.1
MCH (pg)	30.4 ± 1.6	30.2 ± 1.6
MCHC (%)	34.5 ± 0.8	33.8 ± 0.9
RDW (%)	13.2 ± 0.6	13.6 ± 0.9
RDW-SD (fL)	$39.7 \pm 1.8^*$	$42.7 \pm 3.1^*$
MAF (fL)	$13.6 \pm 1.2^*$	$11.6 \pm 1.1^*$
Platelet count ($\times 10^9/L$)	243.2 ± 45.6	264.6 ± 42.6
Plateletcrit (%)	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.03
MPV (fL)	8.3 ± 1.1	8.2 ± 0.8
PDW (%)	$16.3 \pm 0.4^*$	16.0 ± 0.4

Mean $\pm$ standard deviation; *n = 25

Table 2 Comparison mean of leukocyte counts by Coulter LH780, manual reference count and CellaVision DM96

Parameters	Coulter LH 780	Manual reference method			CellaVision DM 96						
		MT 1	MT 2	Mean	Pre-classification			Post-classification			
					MT 1	MT 2	Mean (Pre)	MT 1	MT 2	Mean (Post)	
Neutrophil											
Mean ± SD	58.2 ± 6.0	56.3 ± 7.8	54.5 ± 8.0	55.4 ± 7.8	49.7 ± 10.3	50.5 ± 9.4	50.1 ± 9.2	52.3 ± 9.8	52.2 ± 8.9	52.2 ± 8.7	
95% range	45.9 - 69.4	37.1 - 71.5	35.6 - 75.3	36.8 - 72.6	27.9 - 67.5	32.5 - 69.6	31.3 -69.2	32.5 - 69.1	34.9 - 69.7	34.5 - 69.9	
Lymphocyte											
Mean ± SD	31.6 ± 5.9	34.6 ± 8.4	36.5 ± 7.9	35.5 ± 7.9	35.4 ± 9.2	35.2 ± 9.0	35.3 ± 8.2	38.7 ± 9.7	38.7 ± 9.2	38.7 ± 8.8	
95% range	21.0 - 42.9	18.0 - 52.5	20.0 - 56.2	21.4 - 54.0	16.3 - 55.0	16.7 - 52.9	16.1 - 50.4	18.2 - 58.6	19.2 - 56.6	19.0 - 55.7	
Monocyte											
Mean ± SD	7.2 ± 1.7	5.2 ± 2.1	5.5 ± 2.0	5.4 ± 1.8	5.1 ± 2.5	5.5 ± 2.3	5.3 ± 1.9	5.5 ± 2.4	5.4 ± 2.1	5.5 ± 1.8	
95% range	4.8 - 12.0	1.5 - 10.5	1.8 - 9.5	2.5 - 9.5	0.4 - 10.8	1.7 - 12.0	1.7 - 9.8	1.7 - 10.7	1.7 - 10.9	2.0 - 9.6	
Eosinophil											
Mean ± SD	2.4 ± 1.2	2.5 ± 1.6	2.4 ± 1.6	2.4 ± 1.4	2.3 ± 1.9	2.4 ± 1.8	2.4 ± 1.4	2.1 ± 1.9	2.2 ± 1.8	2.2 ± 1.4	
95% range	0.6 - 5.0	0.0 - 6.2	0.3 - 5.7	0.4 - 5.6	0.0 - 6.7	0.0 - 6.2	0.4 - 5.7	0.0 - 6.7	0.0 - 6.7	0.0 - 5.3	
Basophil											
Mean ± SD	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.7	0.8 ± 0.8	0.8 ± 0.6	0.8 ± 1.1	0.9 ± 1.1	0.9 ± 0.8	1.0 ± 1.1	0.9 ± 1.0	1.0 ± 0.8	
95% range	0.2 - 1.7	0.0 - 2.7	0.0 - 3.0	0.0 - 2.0	0.0 - 3.3	0.0 - 3.7	0.0 - 3.0	0.0 - 4.1	0.0 - 3.5	0.0 - 2.8	
Band form											
Neutrophil											
Mean ± SD	-	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.3	1.3 ± 2.1	1.1 ± 1.8	1.2 ± 1.8	0.1 ± 0.4	0.3 ± 0.6	0.2 ± 0.4	
95% range	-	0.0 - 2.0	0.0 - 1.2	0.0 - 1.1	0.0 - 6.7	0.0 - 6.2	0.0 - 6.6	0.0 - 1.7	0.0 - 2.1	0.0 - 1.3	

MT = Medical technologist

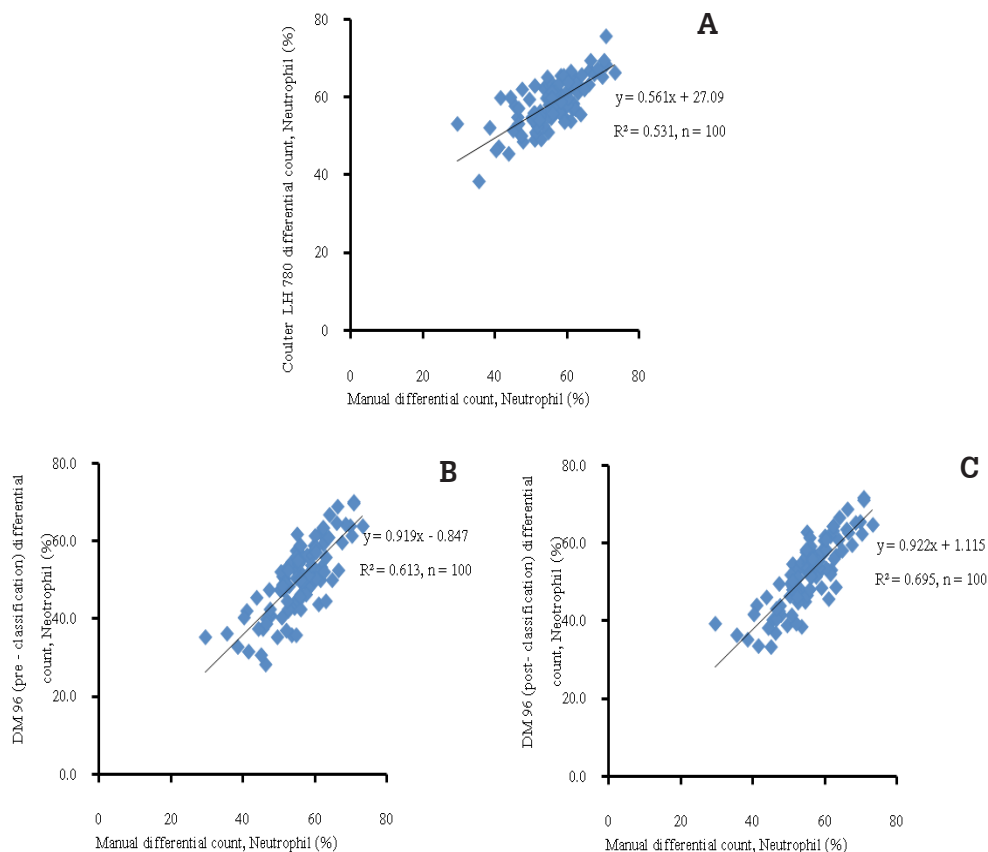
**Figure 2** Correlation of neutrophil count by manual differentials (reference method) versus; **A)** Coulter LH780; **B)** CellaVision DM96 pre-classification; **C)** CellaVision DM96 post-classification

Table 3 Comparison of differential leukocytes by Coulter LH780, manual reference count and CellaVision DM96.

Method y	Method x	r	Bias (cells)	Limits of agreement	
				Low (cells)	High (cells)
Neutrophil					
Coulter LH780	Manual reference count	0.729*	-2.8	-13.3	7.7
DM96 pre-classification	Manual reference count	0.783*	5.3	-6.0	16.6
DM96 post-classification	Manual reference count	0.834*	3.2	-6.3	12.6
DM96 pre-classification	DM96 post-classification	0.963*	-2.1	-7.0	2.7
Lymphocyte					
Coulter LH780	Manual reference count	0.763*	4.0	-6.0	13.9
DM96 pre-classification	Manual reference count	0.579*	0.2	-9.7	10.2
DM96 post-classification	Manual reference count	0.608*	-3.2	-12.1	5.8
DM96 pre-classification	DM96 post-classification	0.956*	3.4	-1.7	8.5
Monocyte					
Coulter LH780	Manual reference count	0.632*	-1.8	-4.7	1.1
DM96 pre-classification	Manual reference count	0.501*	0.0	-3.6	3.6
DM96 post-classification	Manual reference count	0.505*	-0.1	-3.8	3.6
DM96 pre-classification	DM96 post-classification	0.945*	0.1	-1.1	1.3
Eosinophil					
Coulter LH780	Manual reference count	0.746*	0.0	-1.8	1.9
DM96 pre-classification	Manual reference count	0.521*	0.0	-2.6	2.7
DM96 post-classification	Manual reference count	0.544*	0.2	-2.4	2.8
DM96 pre-classification	DM96 post-classification	0.929*	-0.2	-1.2	0.8
Basophil					
Coulter LH780	Manual reference count	0.248 (p = 0.013)	0.2	-1.0	1.4
DM96 pre-classification	Manual reference count	0.216*	-0.1	-1.8	1.6
DM96 post-classification	Manual reference count	0.303 (p = 0.002)	-0.2	-1.8	1.4
DM96 pre-classification	DM96 post-classification	0.676*	0.1	-1.2	1.4
Band form neutrophil					
DM96 pre-classification	Manual reference count	0.409*	-1.1	-4.2	2.0
DM96 post-classification	Manual reference count	0.211 (p = 0.036)	-0.4	-2.0	1.3
DM96 pre-classification	DM96 post-classification	0.252 (p = 0.012)	-0.7	-2.4	1.0

* $p < 0.001$; DM96 = CellaVisionDM96

จำนวนทั้งหมดของเม็ดเลือดขาวที่เครื่องอัตโนมัติรายงาน 9,530 เซลล์ เทียบกับวิธีนับแยกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (10,000 เซลล์) พบว่ามีความถูกต้องร้อยละ 95.3

วิจารณ์

ค่าเฉลี่ยของนิวโทรฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ ที่ได้จากการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาววิธีต่างๆ ในการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องความแตกต่างของการและวิธีการจำแนกเซลล์ เครื่องอัตโนมัติ Coulter LH780 ใช้หลักการวัดปริมาตร สภาพความนำคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและการกระเจิงแสงเมื่อเซลล์กระทบลำแสงเลเซอร์ (volume conductivity

scatter) ในการวิเคราะห์จำแนกเซลล์จะนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดประมาณ 8,000 เซลล์ ส่วนการตรวจดูสเมียร์เลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยทั่วไปจะนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวเพียง 100 เซลล์ รวมถึงเครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน¹⁰ ซึ่งนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวจากสเมียร์เลือด 2 แผ่นๆ ละ 200 เซลล์โดยนักเทคนิคการแพทย์ 2 คน เครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 ผู้ใช้สามารถกำหนดให้นับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวในการ pre-classification ตั้งแต่ 100-400 เซลล์/สเมียร์เลือด ในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้เครื่องอัตโนมัตินับจำนวนเม็ดเลือดขาว 120 เซลล์/สเมียร์เลือด ซึ่งความเร็วในการทำงานประมาณ 30-35 ราย/ชั่วโมง⁵ ข้อจำกัดของหลักการถ่ายภาพคือนอกจากภาพ

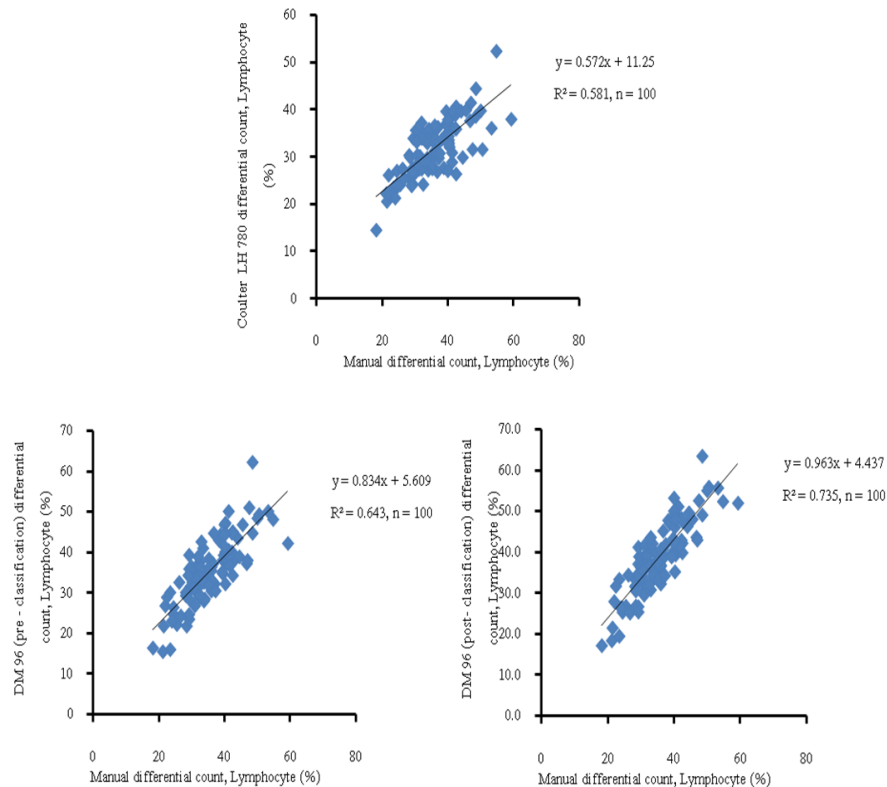


Figure 3 Correlation of lymphocyte count by manual differentials (reference method) versus: **A)** Coulter LH780; **B)** CellaVision DM96 pre-classification; **C)** CellaVision DM96 post-classification

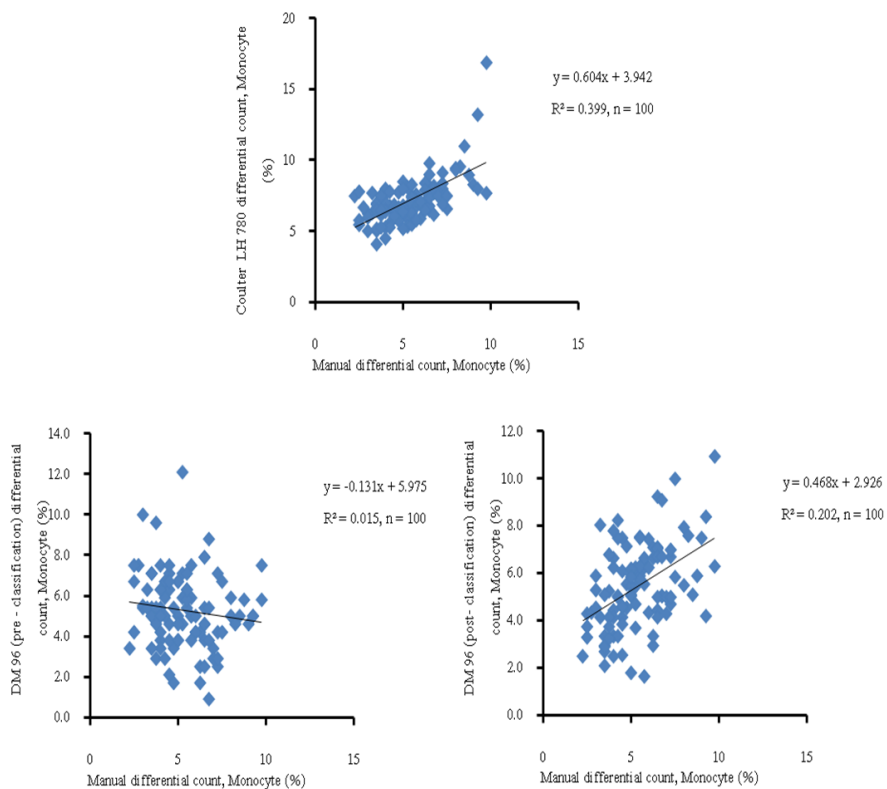


Figure 4 Correlation of monocyte count by manual differentials (reference method) versus: **A)** Coulter LH780; **B)** CellaVision DM96 pre-classification; **C)** CellaVision DM96 post-classification

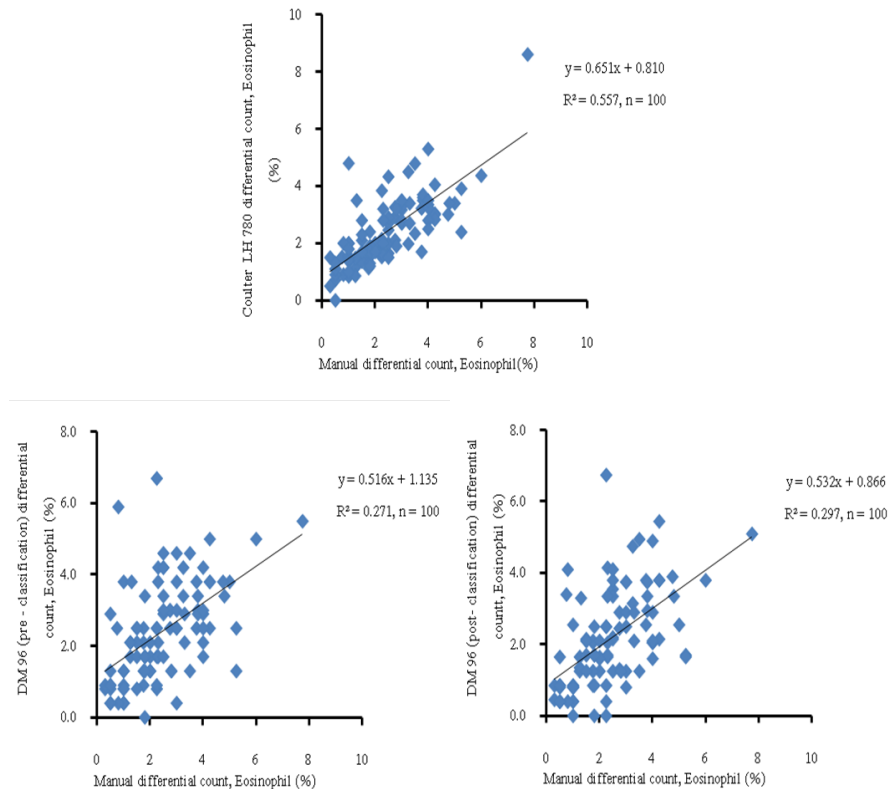


Figure 5 Correlation of eosinophil count by manual differentials (reference method) versus: **A)** Coulter LH780; **B)** CellaVision DM96 pre-classification; **C)** CellaVision DM96 post-classification

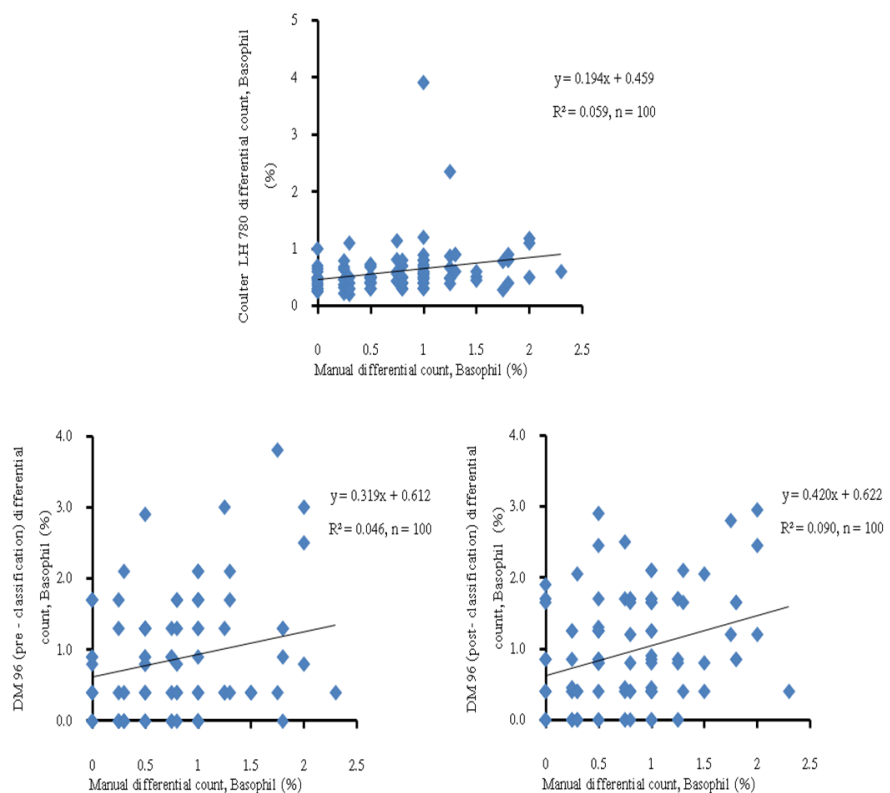


Figure 6 Correlation of basophil count by manual differentials (reference method) versus: **A)** Coulter LH780; **B)** CellaVision DM96 pre-classification; **C)** CellaVision DM96 post-classification

ของเม็ดเลือดขาวและ unidentified cell แล้วจะมีภาพบางส่วนที่ไม่ใช่เม็ดเลือดขาว (non white blood cell) ดังนั้นการกำหนดให้เครื่องนับจำนวนเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์จะทำให้ได้จำนวนเซลล์ไม่ครบหลังจากทำ post-classification ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความคลาดเคลื่อนเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ รวมกับ unidentified cells 4.7 ± 4.0 ค่าของสิ่งอื่นๆ ที่ไม่ใช่เม็ดเลือดขาวใน pre-classification มีความคลาดเคลื่อนเป็นร้อยละ giant platelet 8.1 ± 8.4 , platelet aggregation 2.0 ± 3.1 , smudge cell 7.4 ± 4.6 และ artifacts 21.6 ± 27.0

ปัญหาที่สำคัญของการตรวจดูสเมียร์เลือด เริ่มตั้งแต่ วิธีการเตรียมสเมียร์เลือด ในการศึกษาที่ผ่านมานิยมใช้วิธีเตรียมจากเครื่องทำสเมียร์เลือดและย้อมสีอัตโนมัติ เช่น Miniprep (Geometric Data, USA)⁶, Sysmex SP-100 (Sysmex, Japan)⁷ เป็นต้น การได้สเมียร์เลือดจะมีความยาวมาตรฐาน มีการปรับค่ามุมของตัวไถ ตามค่าฮีสมาโตครีท แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี manual โดยกำหนดให้ทำสเมียร์ที่ไม่หนาหรือบางจนเกินไป ย้อมติดสีถูกต้อง และมีความยาวของสเมียร์ประมาณ 3 ซม. นอกจากนี้มีปัญหारेื่องการกระจายตัวของเม็ดเลือดขาวและความผิดพลาดทางสถิติ เนื่องจากการเป็นกลุ่มตัวอย่างนับจำนวนเซลล์ไม่มากพอ (100 เซลล์) ความแตกต่างในการตัดสินใจระบุชนิดของเซลล์ของผู้รายงาน¹⁻⁴ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้จากวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์กับเครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 หลังจากการทำ post-classification จะมีค่าใกล้เคียงกัน และพบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จาก pre-classification ของนิวโทรฟิลและลิมโฟไซต์ต่ำกว่าทุกวิธี แต่เมื่อดูโดยภาพรวมค่าพิสัย 95% ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของการศึกษาค้างนี้ค่อนข้างต่ำกว่าการศึกษาอื่นๆ^{6,7} อาจเนื่องจากความแตกต่างของวิธีการและจำนวนตัวอย่างตรวจ ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Ceelie และคณะ⁸ ใช้ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย 200 รายโดยที่แต่ละรายจะทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวโดยเครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 จำนวน 400 เซลล์เท่ากับวิธีอ้างอิง

การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่ใช้เวลา และผู้ปฏิบัติการที่มีประสบการณ์ วิธีนี้มีข้อจำกัดจากการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวเพียง 100 เซลล์ การเตรียมสเมียร์เลือดทำให้เกิด random error และเกิดจากความแตกต่างระหว่างผู้ทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวแต่ละคน ซึ่งการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีใช้เครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 สามารถช่วย

ลดภาระงานเบื้องต้นในการจำแนกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติได้จากสเมียร์เลือดที่มีคุณภาพดี และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว แต่การตรวจดูสเมียร์เลือดโดยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์ก็มีความจำเป็นในกรณีที่พบเซลล์ตัวอ่อนหรือเซลล์ที่ผิดปกติ ความผิดปกติของรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดแดง การติดเชื้อมาลาเรีย เป็นต้น เครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 ช่วยลดความแตกต่างระหว่างบุคคล เพราะสามารถเรียกรูปภาพเซลล์มาดูซ้ำ หรือส่งผ่านรูปภาพเข้าไปในระบบ network เพื่อทำให้สามารถเรียกดูได้โดยไม่ต้องอยู่ในห้องปฏิบัติการ

Cornet และคณะ¹¹ ได้ประเมินเครื่อง CellaVision DM96 ในการนำมาใช้งานประจำวัน และผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งทางระบบโลหิตวิทยา จำนวนรวม 440 ราย ที่เครื่องอัตโนมัติ Sysmex XE-2100 รายงานว่ามีผลผิดปกติ พบว่ามีเพียงร้อยละ 2.6 ที่เครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 ไม่สามารถรายงานรูปร่างเซลล์ผิดปกติ แต่ post-classification พบว่าวิธีดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันดีกับวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์และมีความถูกต้องร้อยละ 98 และเสนอว่าการใช้เครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน และเรื้อรัง Briggs และคณะ¹² ได้ศึกษาตัวอย่างเลือดคนปกติ 45 ราย และผู้ป่วย 136 ราย พบว่าการรายงานผล pre-classification ของเครื่อง CellaVision DM96 มีความถูกต้องร้อยละ 89.2 และความแม่นยำเหมือนการวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์ แต่สะดวก และรวดเร็วกว่า จากการศึกษาของ Billard และคณะ¹³ โดยเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเด็กแรกเกิดและทารก 521 ราย พบว่าการแยกชนิดเม็ดเลือดขาวทั้งวิธีใช้เครื่อง CellaVision DM96 และกล้องจุลทรรศน์ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันดี ยกเว้นในรายที่มี blast ซึ่งเครื่อง CellaVision DM96 จะประเมินได้ต่ำกว่า (underestimated) และเสนอว่าวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์ยังมีความจำเป็นในกรณีที่ภาพไม่ชัด ตัวอย่างเช่น ในกรณีที่พบ lymphoblast หรือ มีการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ Riedl และคณะ¹⁴ ได้รายงานใช้ DM96 การศึกษาสารน้ำ (body fluid) 177 ราย พบว่าความถูกต้องของ pre-classification ร้อยละ 90 ในตัวอย่างตรวจจากน้ำไขสันหลัง และร้อยละ 83 สำหรับสารน้ำที่ได้จากแหล่งอื่นๆ และมีความสัมพันธ์กันดีระหว่าง pre-classification และ post-classification และสรุปว่าสามารถนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปตรวจสอบสารน้ำต่างๆ ได้

สรุป

การศึกษาครั้งนี้ให้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับค่าเฉลี่ยและพิสัยร้อยละ 95 ของการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวของกลุ่มผู้ที่มีค่า CBC อยู่ในช่วงค่าอ้างอิงโดยวิธีใช้เครื่องอัตโนมัติ CellaVision DM96 เปรียบเทียบกับวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์และเครื่องอัตโนมัติ Coulter LH 780 ซึ่งมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าผิดปกติทางโลหิตวิทยาเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาววิไลพร เชื้อนแก้ว และ นางสาวกัลยาณี นาสวนโคภิต ที่ช่วยรวบรวมข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Stiene-Martin AE. Causes for poor leukocyte distribution in manual spreader-slide blood films. *Am J Med Tech* 1980;46:624-32.
2. Römke CL. Statistical reflections on finding atypical cells. *Blood Cells* 1985;11:141-4.
3. Römke CL. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. *Blood Cells* 1985;11:311-5.
4. Pierre RV. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med* 2002;22:279-97.
5. CellaVision AB. User's manual 3.1 of CellaVision® DM96. Lund; Sweden. 2010.
6. Kratz A, Bengtsson H-I, Casey JE, Keefe JM, Beatrice GH, Grzybek DY, et al. Performance evaluation of the CellaVision DM96 system. Wbc differentials by automated digital image analysis supported by an artificial neural network. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 770-81.
7. Ceelie H, Dinkelaar RB, van Gelder W. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and CellaVision DM96. *J Clin Pathol* 2006; 60:72-9.
8. พรวิทย์ ลำเจียกเทศ, อุไรวรรณ แก้วบวร, จิรศักดิ์ ปฐมวัฒนาวรรักษ์, นฤมล โชคคุณะวัฒนา. ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ VCS กับการตรวจพบ band form neutrophil และ atypical lymphocyte ในสเมียร์เลือด. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2554;23:128-41.
9. Maedel LB, Doig K. Examination of the peripheral blood film and correlation with complete blood count. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. eds. *Hematology: clinical principles and applications*. 4th ed., Missouri: Elsevier Saunders; 2011. 192-209.
10. NCCLS. Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental method. Approved standard, NCCLS Document H20-A, 1992.
11. Cornet E, Perol J-P, Troussard X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision™ DM 96 system in routine analysis and patients with malignant hematological diseases. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30: 536-42
12. Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavaraja V, et al. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system. *Int Jnl Lab Hem* 2009; 31: 48-60.
13. Billard M, Lainey E, Armoogum P, Alberti C, Fenneteau O, Da Costa L. Evaluation of the CellaVision™ DM automated microscope in pediatrics. *Int Jnl Lab Hem* 2009; 32: 530-8.
14. Riedl JA, Dinkelaar RB, Van Gelder W. Automated morphological analysis of cells in body fluids by the digital microscopy system DM96. *J Clin Pathol* 2010 ;63:538-43.

Comparison of Differential Leukocyte Counts by Microscopy and CellaVision DM96

Pornvaree Lamchiagdhase¹, Jirasak Pathomwattananurak², Kanittha Nguanthurd²,

Uraiwan Kaewborworn² and Naruemol Chokkunawattana³

¹Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Mahidol University; ²Hematology Division, Department of Pathology, Pramongkutklao Hospital, Bangkok; ³PCL Holding Co. Ltd. Bangkok, Thailand.

Abstract: Differential counting of leukocytes is a part of complete blood count (CBC), which is an important diagnostic tool and management of patients in the medical practice. Microscopic examination of blood smear is time consuming and requires highly trained personnel. The CellaVision DM96 is an automated image analysis system for peripheral blood smears. The instrument identifies leukocytes and then takes digital images which are analyzed by artificial neural network based on a database of cells and pre-classified according to leukocyte class. The cells are presented to the user on a computer screen for confirmation or reclassification. **Objective:** This study, we evaluated the differential leukocyte counts by using the CellaVision DM96 and compared with manual microscopy as reference method. **Materials and Methods:** The tripotassium-ethylenediaminetetra-acetic acid (K_3 -EDTA) blood samples of 100 subjects (61 males, 39 females), who had CBC results within reference ranges, were obtained from leftover samples which submitted to routine CBC examination at the Hematology Laboratory, Phramongkutklao Hospital. Differential counting of leukocytes were analyzed on the CellaVision DM96 and results were compared with the manual microscopy method. **Results:** The 95% range of differential leukocytes counting from post-classification of CellaVision DM96 were closed to manual microscopy reference method. Correlation coefficients between post-classification released from CellaVision DM96 and the percentage obtained by the reference method were 0.83 (neutrophils), 0.86 (lymphocytes), 0.45 (monocytes), 0.54 (eosinophils), and 0.30 (basophils). **Conclusion:** From our preliminary data, the results of CellaVision DM96 were similar to reference method and could decrease workload on blood smear examination in normal differential leukocyte count. For clinical uses, further studies are needed on the pathological blood samples.

Key Words : ● Automated image analysis ● Microscopy ● Differential leukocyte count

J Hematol Transfus Med 2013;23:23-32.