



การใช้ค่า event/sec ใน single platform โฟลไซโตเมทรีในการคำนวณ absolute CD4 ทีลิมโฟไซต์และจำนวนเม็ดเลือดขาวในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์

สุวรรณณี ลิธัฐพงศ์*

Received : June 17, 2017

Revised: August 25, 2017

Accepted: September 3, 2017

บทคัดย่อ

โฟลไซโตเมทรีแบบ single platform โดยใช้น้ำยาโมโนโคลนัลแอนติบอดี 3 ชนิด และ fluorescent microbeads ที่ทราบค่าเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจนับจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ ส่วนการตรวจแบบ dual platform เป็นวิธีนับจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ในกรณีที่ไม่ใช้ fluorescent microbeads แต่คำนวณจำนวนเซลล์จากจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดทางโลหิตวิทยา งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีคำนวณค่าสัมบูรณ์ของจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ และจำนวนเม็ดเลือดขาวจากค่า event/sec ที่ได้จากการตรวจตัวอย่างเลือดของผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ จำนวน 193 คนโดยใช้โฟลไซโตเมทรีแบบ single platform แต่ไม่ใช้ fluorescent microbeads เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าค่าสัมบูรณ์ของจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์และเม็ดเลือดขาวที่คำนวณจากค่า event/sec ที่ได้จากการตรวจเลือดที่ใช้เวลาไม่เกิน 40 วินาที จะมีความสัมพันธ์ในระดับสูงและไม่แตกต่างกับผลตรวจจากวิธีมาตรฐาน โดยมีค่า $R^2 = 0.9718$, $p = 0.037$ และ $R^2 = 0.9196$, $p < 0.01$ ตามลำดับ นอกจากนี้การตรวจจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์โดยโฟลไซโตเมทรีในการศึกษานี้ได้มีการประเมินความถูกต้อง (%bias) ความแม่นยำ (%CV) และค่าความไม่แน่นอนของการวัด (u_c) อยู่ในเกณฑ์คุณภาพที่ยอมรับ การคำนวณจำนวนเซลล์โดยใช้ค่า event/sec เป็นวิธีการที่สะดวก ช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี dual platform และลดค่าใช้จ่ายในการตรวจโดยวิธี single platform ได้ถึง 18% โดยไม่ลดคุณภาพการตรวจวิเคราะห์

คำสำคัญ: CD4 ทีลิมโฟไซต์, Event/sec, โฟลไซโตเมทรี, เอชไอวี, เอดส์



Event/sec from single platform flow cytometry for calculation of absolute CD4+ T-lymphocyte and total WBC count in HIV/AIDS patients

Suwannee Lirathpong*

Abstract

A single platform flow cytometric analysis using 3 fluorescent-tag monoclonal antibodies and fluorescent microbeads is a standard protocol for measuring CD4+ T-lymphocytes. whereas dual platform techniques require both flowcytometry and hematological analyzer. In this study absolute CD4+ T-lymphocytes and white blood cell (WBC) counts were calculated from event/sec determined from 193 blood samples from HIV infected individuals or AIDS patients by single platform flow cytometry without fluorescent microbeads comparing to the standard protocol. The results showed high correlation of absolute CD4+ T-lymphocytes and WBC counts between two methods with $R^2 = 0.9718$, $p = 0.037$ and $R^2 = 0.9196$, $p < 0.01$, respectively. This modified protocol was also evaluated for analytical accuracy (%bias), precision (%CV) and uncertainty of measurements (U_c). Calculation of absolute CD4+ T-lymphocytes and WBC counts from events/sec is simple, rapid and inexpensive comparing to dual platform measurement. This modified method can also reduce the cost of single platform analysis by 18% without decreasing analytical quality.

Keywords: CD4+ T-lymphocyte, Event/sec, Flow cytometry, HIV, AIDS

Immunology section, Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Saraburi Hospital, Saraburi, 18000

*Corresponding author: (e-mail:suwanneelir@yahoo.co.th)

บทนำ

โรคเอดส์เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสุขภาพปัญหาอันดับต้นๆ ที่มีผลกระทบทั้งด้านเศรษฐกิจและสังคมไทยมานานกว่า 30 ปี สถานการณ์โรคเอดส์ของประเทศไทยในปัจจุบัน พบว่าแต่ละปีจะมีผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 7,000 คน จากการคาดประมาณจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีโดยกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2558 ได้จำนวน 438,100 คน แต่รายงานผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการวินิจฉัย ในปีนี้ มีจำนวน 391,484 คน⁽¹⁾ จึงยังมียังมีผู้ติดเชื้อเอชไอวีอีกประมาณ 47,000 คน ที่ยังไม่ได้รับการตรวจและทราบสถานการณ์ติดเชื้อเอชไอวีของตน ทำให้ขาดโอกาสในการรับบริการดูแลรักษาและป้องกันทั้งของตนเองและคู่ ทำให้เชื้อเอชไอวีมีโอกาสแพร่ไปยังคู่และสังคมของผู้ติดเชื้อโดยไม่รู้ตัว สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติได้จัดทำงบประมาณ แผนงานสนับสนุนระบบบริการผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์⁽²⁾ เพื่อให้เข้าถึงระบบบริการแต่เนิ่นๆ ได้รับการตรวจประเมินการติดเชื้อและตรวจระดับภูมิคุ้มกันเพื่อรับยาต้านไวรัสตลอดจนได้รับการตรวจติดตามผลการรักษาอย่างต่อเนื่องในสังคมไทยเพื่อมุ่งสู่การยุติปัญหาเอดส์ในปี 2573⁽¹⁾

เซลล์ CD4 เป็นเม็ดเลือดขาวทีลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์เป้าหมายที่เชื้อเอชไอวี-1 เข้าไปเพิ่มจำนวนเชื้อและทำลายเซลล์ ทำให้จำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ลดลงเมื่อมีการดำเนินของโรคมามากขึ้น^(3,4) การตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์เป็นการทดสอบอย่างหนึ่งทางห้องปฏิบัติการ ที่สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ (สปสช) ใช้เป็นเกณฑ์ในการพยากรณ์โรค การตัดสินใจเพื่อเริ่มให้ยาต้านไวรัสแก่ผู้ป่วย หรือกรณีให้ยาเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคฉวยโอกาส รวมถึงการติดตามและประเมินผลการรักษา⁽⁴⁾ โดยตั้งแต่ปี 2547 โครงการระดับชาติสำหรับผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ (National Access to Antiretroviral Programs for Program for people with HIV/AIDS หรือที่รู้จักกันว่า NAPHA) กำหนดให้ผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ รับยาต้านไวรัสเมื่อมี CD4 เซลล์ต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร^(5,6) โดยให้เข้ารับการตรวจติดตามระดับเซลล์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ ปีละ 2 ครั้ง และเพื่อให้ผู้ติดเชื้อเอชไอวี และผู้ป่วยเอดส์

สามารถเข้าถึงบริการยาต้านไวรัสเอดส์ได้เร็วขึ้นในปี พ.ศ. 2553 โครงการฯ จึงได้กำหนดนโยบายให้ยาต้านไวรัสกับผู้ที่มิเซลล์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ต่ำกว่า 350 เซลล์ต่อไมโครลิตร ซึ่งกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขได้ประกาศให้ใช้เกณฑ์นี้เมื่อ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2555⁽⁴⁾ ในปี พ.ศ. 2559 กระทรวงสาธารณสุข สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติและศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย เตรียมออกประกาศแนวทางปฏิบัติรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ ให้ได้รับยาต้านไวรัสทันทีที่ติดเชื้อ และตรวจเฉพาะค่า CD4 ทีลิมโฟไซต์เมื่อรักษาต่อเนื่อง 1 ปี⁽²⁾ โดยตรวจปีละ 2 ครั้งจนกว่าระดับ CD4 ทีลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้นมากกว่า 350 เซลล์ต่อไมโครลิตร⁽⁴⁾ การวัด CD4 ทีลิมโฟไซต์ จึงมีความสำคัญต่อการพยากรณ์ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและการรักษา รวมทั้งการประเมินประสิทธิผลของยาต้านไวรัสที่ใช้ และการประเมินการให้ยาป้องกันหรือรักษาโรคฉวยโอกาสต่างๆ ซึ่ง World Health Organization (WHO) ได้มีการสนับสนุนให้ใช้การนับ CD4 ทีลิมโฟไซต์ เป็นพื้นฐานสำหรับบ่งชี้ว่าการรักษาล้มเหลวในสถานที่ที่มีทรัพยากรจำกัด ไม่สามารถตรวจ viral load ได้^(7,8) จากนโยบายและเกณฑ์ดังกล่าวจึงทำให้มีผู้มารับบริการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์จำนวนเพิ่มขึ้น ภาระงาน และค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์จึงเพิ่มขึ้นด้วย

การตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์โดยเครื่องโฟลไซโทเมทรีสามารถตรวจได้ทั้งแบบ single platform ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน⁽⁹⁾ ที่นับ CD4 ทีลิมโฟไซต์จากการวิเคราะห์สัญญาณฟลูออเรสเซนส์แล้วคำนวณค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเซลล์ เปรียบเทียบกับ fluorescent micro beads ที่ทราบจำนวนที่ถูกต้อง และแบบ dual platform ที่ไม่ใช้ fluorescent micro beads แต่ใช้เครื่องโฟลไซโทเมทรีหาค่าร้อยละของ CD4 ทีลิมโฟไซต์ นำมาหาค่าสัมบูรณ์ (absolute CD4 T lymphocyte) โดยคำนวณกับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ได้จากผลตรวจ complete blood count (CBC) โดยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดทางโลหิตวิทยา (hematology analyzer) การทำ dual platform จะมีค่าผิดพลาดได้จากการใช้เครื่อง ตรวจวิเคราะห์ 2 ชนิด⁽¹⁰⁾ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นจากการใช้เครื่องตรวจ 2 เครื่อง

งานภูมิคุ้มกัน กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสระบุรี ได้ให้บริการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์โดยเครื่องโฟลไซโทเมทรีซึ่งสามารถทำได้ทั้งแบบ single platform และแบบ dual platform มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์มารับบริการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์ที่โรงพยาบาลสระบุรีจำนวนปีละประมาณ 4,200 คน มีค่าใช้จ่ายประมาณ 500 บาทต่อการวิเคราะห์ การตรวจปีละ 2 ครั้งสำหรับตรวจติดตามการรักษาผู้ที่รับยาต้านไวรัส คิดเป็นค่าใช้จ่าย 4.2 ล้านบาทต่อปี โดยค่าใช้จ่ายนี้จะสูงขึ้นมากถึง 391.5 ล้านบาทสำหรับการตรวจผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ จำนวน 391,484 คน ที่มีรายงานในปี พ.ศ. 2558 ทำให้รัฐต้องใช้งบประมาณชดเชยในการนี้เป็นจำนวนมาก เพื่อลดงบประมาณของรัฐสำหรับค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ แต่ผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ยังคงได้รับบริการเช่น เดิม ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาและประเมินประสิทธิภาพการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์แบบ single platform แต่ไม่ต้องใช้ fluorescent microbeads (ที่เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ค่าตรวจมีราคาสูง) โดยการนำค่า Event/sec ที่ได้จากการนับเซลล์จากเครื่องโฟลไซโทเมทรี มาคำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดขาวและค่าสัมบูรณ์ของ CD4 ทีลิมโฟไซต์ เปรียบเทียบผลการคำนวณที่ได้กับวิธีมาตรฐานที่ใช้ fluorescent microbeads และไม่ต้องใช้การวิเคราะห์ตัวอย่างตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดทางโลหิตวิทยา เพื่อหาจำนวนเม็ดเลือดขาวอย่างวิธี dual platform ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์โดยไม่ลดคุณภาพงาน

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

ข้อมูลวิเคราะห์จากตัวอย่างเลือดในหลอดที่มี K₃ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งที่ส่งตรวจในงานภูมิคุ้มกัน กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิกโรงพยาบาลสระบุรี ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดที่เก็บจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ที่มารับบริการตรวจที่โรงพยาบาลสระบุรี จำนวน 193 ราย ที่ผ่านการตรวจสอบยืนยันผลบวก AntiHIV ด้วยวิธีตรวจ 3 วิธีที่ใช้หลักการตรวจและแอนติเจนต่างกัน

วิธีการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์ โดย Trichrome fluorescent stain method

โดยดูดเลือดแต่ละตัวอย่างใส่ลงในหลอดทดสอบฟอลคอนโพลีสไตรีน 2 หลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร เติมน้ำยา triCHROME (CD45-FTIC/CD4-RD1/CD3-PC5) (Beckman Coulter Inc., Florida, USA) หลอดละ 10 ไมโครลิตร ผสมตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 นาทีในที่มืด แล้วนำเข้าเครื่อง TQ-Prep Workstation (Beckman Coulter Inc., Florida, USA) เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตรึงและรักษาสถียรภาพเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นผสม fluorescent microbeads (Flow-Count fluorospheres) 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดสอบหลอดหนึ่ง ก่อนนำหลอดทั้งสองไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทเมทรี (รุ่น Cytomics FC 500, Beckman Coulter Inc., Florida, USA)

การคำนวณ event/sec ค่าสัมบูรณ์ของจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ และจำนวนเม็ดเลือดขาวจากข้อมูลผลวิเคราะห์

นำข้อมูล event และ time(sec) มาคำนวณ event/sec แล้วนำค่า event/sec มาคำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาว (absolute white blood cell count, WBC count) จากสูตร $\text{event/sec} \times 10$ โดย factor 10 ในสูตรเป็นค่าเฉลี่ยของสัดส่วนระหว่าง WBC count ที่วิเคราะห์โดยตรงจากวิธีมาตรฐานกับค่า event/sec จากวิธีที่ศึกษาครั้งนี้ ที่ให้ผลความสัมพันธ์มากกว่า 95% จากนั้นนำค่า WBC count ที่ได้มาคำนวณ ค่าสัมบูรณ์ของจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์เก็บข้อมูลผลวิเคราะห์โดยเครื่องโฟลไซโทเมทรีจากหลอดทดสอบที่ไม่ได้เติม fluorescent microbeads จำนวน 4 ค่า ได้แก่ event, time (sec), %lymphocyte และ %CD4 T lymphocyte นำข้อมูล event และ time(sec) มาคำนวณ event/sec แล้วนำค่า event/sec มาคำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาว (absolute white blood cell count, WBC count) จากสูตร $\text{event/sec} \times 10$ จากนั้นนำค่า WBC count ที่ได้มาคำนวณ ค่าสัมบูรณ์ของจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ (absolute CD4+ T-lymphocyte) จากสูตร $(\text{WBC count} \times \% \text{lymphocyte} \times \% \text{CD4+ T-lymphocyte}) / 10,000$ นำข้อมูลที่คำนวณได้มา

เปรียบเทียบกับค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC count) และค่าสัมบูรณ์ของจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ (absolute CD4+ T-lymphocyte) ที่วิเคราะห์โดยตรงจากหลอดทดสอบที่เติม fluorescent microbeads (วิธีมาตรฐาน)

การประเมินคุณภาพการวิเคราะห์โดยเครื่องโฟลไซโทเมทรี

ในการตรวจสอบสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยจะต้องมีคุณภาพตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บสิ่งส่งตรวจ การวิเคราะห์ และการรายงานผล ผลตรวจที่ถูกต้องจะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วย ในการศึกษาได้ประเมินคุณภาพการวิเคราะห์โดยประเมินความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) และความไม่แน่นอนของการวัด (uncertainty of measurement) ในการตรวจค่า CD4 ทีลิมโฟไซต์โดยใช้เครื่องโฟลไซโทเมทรีตลอดจนควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ โดยใช้เครื่องโฟลไซโทเมทรีเครื่องเดียวกันตลอดการศึกษา ตรวจสอบคุณภาพการวิเคราะห์ด้วยสารควบคุมคุณภาพ (Immuno-Trol) 2 ระดับ ที่มี CD4 ทีลิมโฟไซต์ ทั้งค่าปกติ (Normal level control) และค่าต่ำ (Low level control) และทำการตรวจสอบเครื่องโฟลไซโทเมทรีโดยใช้ Flow-Check และ Flow-Set ซึ่งเป็นสารตรวจสอบสัญญาณและชนิดความยาวของแสงก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจากผู้ป่วย

การประเมินความแม่นยำ (precision)⁽¹¹⁾ โดยรวบรวมข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายในด้วยสารควบคุมคุณภาพ (Immuno-Trol) ทั้งค่าปกติและค่าต่ำเป็นเวลา 6 เดือน คำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และแสดง imprecision ด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ coefficient of variation (%CV)

การประเมินความถูกต้อง (accuracy)⁽¹¹⁾ ข้อมูลจากการเข้าร่วมโครงการประกันคุณภาพการวิเคราะห์ โดยองค์กรภายนอก (External quality assessment, EQA) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการคำนวณค่า %bias เพื่อประเมินความถูกต้องของการวิเคราะห์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ โดยห้องปฏิบัติการได้เข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพ Center of Excellence for Flow Cytometry

คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล และนำผลประเมินมาคำนวณหาค่า %bias จากสูตร $\%bias = (lab\ assay\ value - group\ mean) \times 100 / group\ mean$

การหาค่าความไม่แน่นอนของการวัด (uncertainty of measurement, u_c)^(12,13) ค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับผลการตรวจในงานวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ผู้ให้บริการสามารถขอให้ห้องปฏิบัติการแสดงค่าความไม่แน่นอนของการวัดของการวิเคราะห์เพื่อนำไปประกอบการใช้ผลวิเคราะห์นั้นได้ ในศึกษานี้ คำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดแบบ top down approach เปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบที่เป็นวิธีเดียวกัน (โฟลไซโทเมทรี) ดังนั้นจึงคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากสูตร (u_c) = (CV_u) และนำค่า u_c ที่คำนวณได้จะนำมาคูณกับ coverage factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2 เพื่อแสดงค่าความไม่แน่นอนของการวัด ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ค่าสัมบูรณ์ของ CD4 ทีลิมโฟไซต์ และค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยวิธีที่คำนวณจาก event/sec กับวิธีมาตรฐาน

ผลการตรวจค่าสัมบูรณ์ของ CD4 ทีลิมโฟไซต์ และค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยวิธีที่คำนวณจาก event/sec เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ตรวจนับจำนวนเซลล์โดยตรงจากเครื่องโฟลไซโทเมทรีแบบ single platform ร่วมกับการใช้ fluorescent microbeads แสดงความสัมพันธ์ของวิธีที่ศึกษากับวิธีมาตรฐานด้วยค่า correlation coefficient of determination (R^2) และประเมินนัยสำคัญทางสถิติด้วย t-test ที่ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

การประเมินคุณภาพการวิเคราะห์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ โดย Trichrome fluorescent stain method

การประเมินความแม่นยำ (precision) โดยการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ coefficient of variation (%CV) จากผลวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ของวัสดุควบคุมคุณภาพทั้งค่าปกติ (normal level control) และค่าต่ำ (low level control) ในงานควบคุมคุณภาพภายในของ

ห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งครอบคลุมวัสดุควบคุมคุณภาพจำนวน 4 lots ได้ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปอร์เซ็นต์ coefficient of variation ดังแสดงใน Table 1

การประเมินความถูกต้อง (accuracy) โดยการหาค่าความไม่แน่นอนของการวัด (uncertainty of measurement, u_c) ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวัสดุควบคุมคุณภาพค่าต่ำได้ CD4+ T-lymphocyte $\pm 7.54\%$ และวัสดุควบคุมคุณภาพค่าปกติได้ CD4+ T-lymphocyte $\pm 4.86\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ค่าสัมบูรณ์ของ CD4 ทีลิมโฟไซต์ และค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยวิธีที่คำนวณจาก event/sec กับวิธีมาตรฐานที่เติม fluorescent microbeads

ผลการคำนวณค่าสัมบูรณ์ของ CD4 ทีลิมโฟไซต์ (absolute CD4+ T4-lymphocyte) และค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเม็ดเลือดขาวจาก event/sec ของตัวอย่างทั้งหมด 193 ราย แสดงความสัมพันธ์ในระดับกลางกับวิธีมาตรฐาน โดยมีค่า $R^2 = 0.7506$ ($p < 0.01$) และ ค่า $R^2 = 0.5257$ คำนวณค่า % bias เพื่อประเมินความถูกต้องของการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซต์จากการเข้าร่วมโครงการประกันคุณภาพการวิเคราะห์โดยองค์กรภายนอกจำนวน 6 trials ได้ผลดัง Table 2

($p < 0.01$) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 (Fig 1A, Fig 1B) แต่เมื่อพิจารณาจากข้อมูลเวลาในการวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าข้อมูลที่ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 40 วินาทีจะมีความสัมพันธ์กับวิธีมาตรฐานในระดับสูง โดยมีค่า $R^2 = 0.9196$ และ $R^2 = 0.9718$, $p < 0.01$ และ $p = 0.037$ สำหรับการวิเคราะห์ค่าสัมบูรณ์ของ CD4 ทีลิมโฟไซต์ และค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเม็ดเลือดขาวตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2 (Fig 2A, Fig 2B)

Table 1 Precision evaluation from IQC data of %CD4+ T-lymphocyte analyzed by flow cytometry

%CD4+ T-lymphocyte of low level control					%CD4+ T-lymphocyte of normal level control				
Lot	N	Mean	SD	%CV	Lot	N	Mean	SD	%CV
1	20	17.53	0.830	4.73	1	22	49.48	1.075	2.18
2	17	19.18	0.527	2.75	2	17	46.34	0.935	3.50
3	10	24.76	0.543	2.19	3	18	43.56	0.830	1.90
4	13	16.36	0.785	4.70	4	20	48.99	0.843	1.72
AVERAGE %CV				3.77	AVERAGE %CV				2.43

Table 2 Accuracy evaluation from EQA data of %CD4+ T-lymphocyte analyzed by flow cytometry

%Bias of low level samples				%Bias of normal level samples			
Sample	Group	Lab		Sample	Group	Lab	
trial	mean	report	%Bias	trial	mean	report	%Bias
1	22.12	19.7	-10.94	4	35.61	36.6	2.78
2	8.92	8.47	-5.04	5	39.44	35.4	-10.24
3	16.54	17.5	5.80	6	31.68	33.53	5.84
AVERAGE %BIAS			7.26	AVERAGE %BIAS			6.29

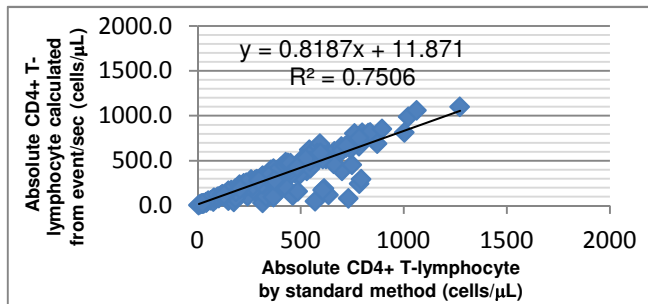


Fig.1A Correlation of absolute CD4+ T-lymphocyte between calculation from event/sec and standard method

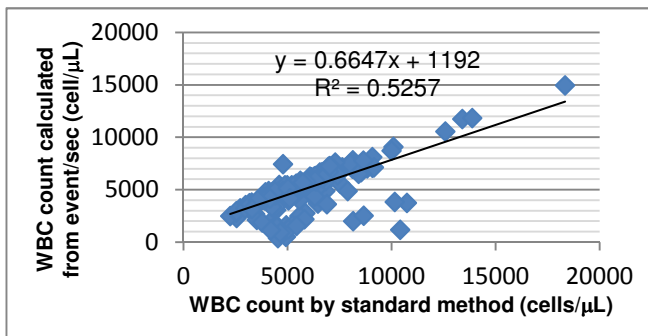


Fig.1B Correlation of WBC count between calculation from event/sec and standard method

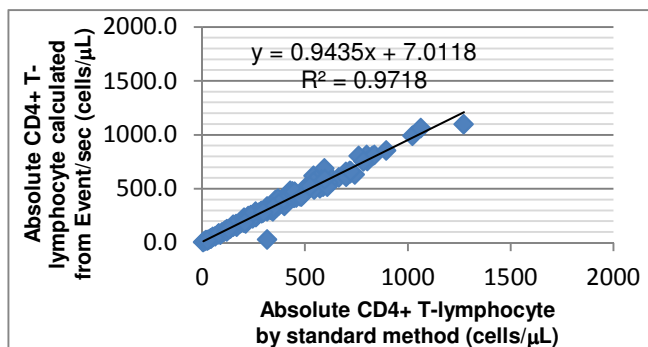


Fig.2A Correlation of absolute CD4+ T-lymphocyte between calculation from event/sec with analysis time less 40 sec. and standard method

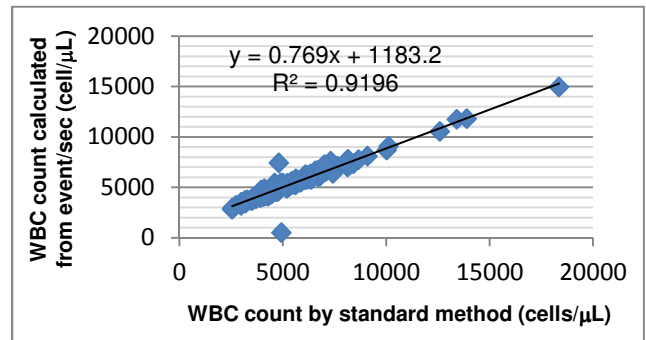


Fig.2B Correlation of WBC count between calculation from event/sec with analysis time less 40 sec. and standard method

วิจารณ์และสรุป

CD4 ทีลิมโฟไซต์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เป็นเซลล์เป้าหมายของเชื้อเอชไอวี เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะเพิ่มจำนวนใน CD4 ทีลิมโฟไซต์ ทำให้เซลล์ตายและลดจำนวนลงจนผู้ติดเชื้อมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การนับจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์จึงเป็นการทดสอบหนึ่งที่ใช้เป็นเกณฑ์ประกอบการพิจารณาการดำเนินโรคของผู้ติดเชื้อเอชไอวีว่าถึงขั้นต้องให้ยาต้านไวรัสหรือเป็นผู้ป่วยเอดส์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขให้ใช้เกณฑ์พิจารณาการเริ่มให้ยาต้านไวรัสเมื่อ CD4 ทีลิมโฟไซต์ต่ำกว่า 350 เซลล์ต่อไมโครลิตร ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2555 นอกจากนี้ CD4 ทีลิมโฟไซต์ยังใช้เป็นเกณฑ์ประกอบการพิจารณาการใช้ยาป้องกันโรคติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infections) ในผู้ป่วย โดยผู้ป่วยจะได้รับยาป้องกัน pneumocystis pneumonia (PCP) เมื่อมีจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ ต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตรหรือได้รับยาป้องกัน toxoplasmosis และ cryptococcosis เมื่อมีจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ ต่ำกว่า 100 เซลล์ต่อไมโครลิตร และถ้า CD4 ทีลิมโฟไซต์ ต่ำกว่า 75 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผู้ป่วยจะได้รับยาป้องกัน mycobacterium avium complex (MAC)⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้ ยังใช้ผลตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์ ในการติดตามผลการรักษาของยาต้านไวรัส สามารถใช้การนับจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์ เพื่อประเมินการรักษาผู้ป่วยในกรณีที่ไม่สามารถตรวจปริมาณไวรัส (viral load) โดยตรง⁽⁷⁾ หรือใช้ประเมินกรณีการรักษาไม่ได้ผล^(7,8) ดังนั้น การตรวจนับจำนวน CD4 ทีลิมโฟไซต์จึงมีความสำคัญในทุกช่วงของการประเมินภาวะ

ภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ คุณภาพการตรวจวิเคราะห์จึงมีความสำคัญต่อผลตรวจ ในการศึกษาเครื่องโฟลไซโทเมทรีที่ใช้มีความแม่นยำ มีค่า %CV เฉลี่ยของการตรวจ 3.77% และ 2.43% ในการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์ที่ค่าต่ำและค่าปกติซึ่งมีค่าไม่เกินเกณฑ์ยอมรับ imprecision ที่ %CV ไม่เกิน 9% ($CV \leq 0.50 CV_i$, within-individual biological variation=18%)^(12,13) และไม่เกินค่า %CV ตามรายงานการประเมินเครื่องวิเคราะห์กลุ่มนี้โดยองค์การอนามัยโลก ที่กำหนดเกณฑ์ %CV น้อยกว่า 8% สำหรับวัสดุควบคุมคุณภาพค่าต่ำ และน้อยกว่า 6% สำหรับวัสดุควบคุมคุณภาพค่าปกติ⁽¹⁵⁾ ผลการประเมินความถูกต้องโดยการคำนวณค่า % bias จากการเข้าร่วมโครงการประกันคุณภาพการวิเคราะห์ โดยองค์ กรภายนอกพบว่าเครื่องโฟลไซโทเมทรีที่ใช้มี %bias เฉลี่ย 7.26% และ 6.29% สำหรับการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์ที่ค่าต่ำและค่าปกติมีค่าสูงกว่ารายงานการศึกษาอื่นที่รายงาน %bias 2.84–5.87%⁽¹²⁾ เนื่องจากข้อมูลค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์จากโครงการประกันคุณภาพฯ ที่เข้าร่วมเป็นสมาชิก เป็นการประเมินผลจากเครื่องวิเคราะห์โดยรวม ไม่ได้วิเคราะห์แยกตามกลุ่มเครื่องมือ จึงอาจส่งผลให้ค่า %bias สูงขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม ผลรวมของ %bias และ %CV ของการวิเคราะห์นี้เมื่อคำนวณจากสูตร total error = %bias + 1.65 (%CV) พบว่ามีค่าไม่เกินค่า CV_i (18%) การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับวัสดุควบคุมคุณภาพค่าต่ำได้ CD4+ T-lymphocyte $\pm 7.54\%$ และวัสดุควบคุมคุณภาพค่าปกติได้ CD4+ T-lymphocyte $\pm 4.86\%$ มีค่าใกล้เคียงกับที่มีในรายงานอื่น⁽¹²⁾

ค่า events เป็นผลการนับจำนวนเซลล์ที่ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ จากการศึกษาพบว่าสามารถใช้ค่า events และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (เวลาที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์) มาคำนวณหาค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเม็ดเลือดขาวและค่าสัมบูรณ์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ของตัวอย่างตรวจได้ ซึ่งให้ผลคำนวณใกล้เคียงกับผลวิเคราะห์ที่คำนวณเปรียบเทียบกับจำนวน fluorescent microbeads (Fig. 1) และจะมีความสัมพันธ์ที่ดีเพิ่มขึ้นในกรณีที่เซลล์ในตัวอย่าง ตรวจใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์

น้อยกว่า 40 วินาที (Fig. 2) จากการศึกษาตัวอย่างจำนวน 193 ตัวอย่าง มี 35 ตัวอย่างที่แสดงเวลาวิเคราะห์เกินกว่า 40 วินาที คิดเป็น 18.1% ในการนับจำนวนเซลล์โดยเครื่องโฟลไซโทเมทรี ความแม่นยำของการนับขึ้นกับ flow rate ของเครื่อง จำนวนเซลล์เป้าหมายที่มีอยู่ จำนวนเซลล์ที่นับและระยะเวลาที่ใช้วิเคราะห์ จากผลวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ของวัสดุควบคุมคุณภาพที่ค่าปกติ (normal level control) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ (เซลล์เป้าหมาย) เฉลี่ยประมาณ 47% จากกลุ่มเซลล์ลิมโฟไซต์ (จำนวนเซลล์ที่นับประมาณ 5,000 เซลล์) พบว่า %CV มีค่า 2.43% แต่เมื่อวิเคราะห์วัสดุควบคุมที่มีค่าต่ำ (low level control) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซต์เฉลี่ยประมาณ 20% พบว่า %CV มีค่าสูงขึ้นเป็น 3.77% ดังนั้น ในกรณีที่วิเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่มีเปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซต์จำนวนที่น้อยกว่า 20 % พบว่า %CV จะมีค่าสูงขึ้น จากผลการศึกษาทางสถิติในการวิเคราะห์เซลล์โดยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีของ Allan A.L. และ Keeney M.⁽¹⁷⁾ ได้รายงานไว้ว่าถ้าจำนวนเซลล์เป้าหมายมีประมาณ 10% ในกลุ่มเซลล์ที่นำมาวิเคราะห์ ค่า % CV ของการวิเคราะห์จะขึ้นกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่วิเคราะห์ เช่น หากวิเคราะห์เซลล์เป้าหมายจากกลุ่มเซลล์จำนวน 100,000 เซลล์ในตัวอย่างตรวจ จะมีค่า %CV ที่ 1% แต่หากวิเคราะห์เซลล์เป้าหมายจากกลุ่มเซลล์ลดลงเป็น 4,000 เซลล์ในตัวอย่างตรวจ %CV ของการวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้นเป็น 5 % และถ้าวิเคราะห์จากกลุ่มเซลล์จำนวน 1,000 เซลล์ในตัวอย่างตรวจ ค่า %CV ของการวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้นเป็น 10% ซึ่งตัวอย่างตรวจในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างตรวจจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซด์ลดลงต่ำกว่าปกติ และมีกลุ่มเซลล์ลิมโฟไซด์ลดลงในบางราย เปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซด์ที่ลดลงนี้ ส่งผลให้ค่า %CV ของการวิเคราะห์สูงขึ้นตามที่ Allan A.L. และ Keeney M. ได้รายงานไว้ นอกจากนี้ ในกรณีที่ตัวอย่างตรวจมีจำนวนเซลล์ที่ลดลง การนับจำนวนเซลล์ด้วย flow rate ของเครื่องจึงต้องใช้เวลาวิเคราะห์นานขึ้นจากเดิมเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์มาวิเคราะห์เพิ่มขึ้นตามที่กำหนด การใช้เวลาวิเคราะห์นานขึ้นย่อมส่งผลต่อค่า %CV ได้เช่นกัน ซึ่ง %CV ที่เพิ่มขึ้น

จะกระทบต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ correlation coefficient of determination (R^2) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ประเมินเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ที่ให้ผล event/sec ของตัวอย่างตรวจได้ถูกต้อง สอดคล้องกับผลตรวจตามวิธีมาตรฐาน โดยใช้ correlation coefficient of determination (R^2) ที่มีความสอดคล้องของข้อมูลมากกว่า 90% และมีนัยสำคัญทางสถิติ (t-test ที่ $p < 0.05$) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า ข้อมูลที่มีผลวิเคราะห์ในเวลา 40 วินาที หรือน้อยกว่าจะมีความสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน (Fig.2) การใช้เวลาวิเคราะห์ที่นานขึ้นความสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานจะลดลงต่ำกว่า 90 % (Fig. 1) และตัวอย่างตรวจที่ใช้เวลาวิเคราะห์นานกว่า 40 วินาที มีจำนวน 66 % ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ต่ำกว่า 20%

การนำค่า events และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์มาคำนวณค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเม็ดเลือดขาวและค่าสัมบูรณ์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ของตัวอย่างตรวจในการศึกษานี้ นอกจากจะช่วยลดต้นทุนในส่วนของ fluorescent microbeads แล้วยังสามารถทำการวิเคราะห์แบบ single platform ได้ ผู้ที่ตรวจวิเคราะห์แบบ dual platform สามารถปรับเปลี่ยนวิธีการตรวจมาเป็นแบบ single platform technique ได้ ช่วยให้ผู้ใช้วิเคราะห์ลดภาระงานและเวลาตรวจ (turnaround time) ในการนำตัวอย่างไปตรวจนับเม็ดเลือดขาวจากเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดทางโลหิตวิทยาและลดการปนเปื้อนของตัวอย่าง ลดการกระจายเชื้อจากตัวอย่างตรวจเนื่องจากสามารถตรวจได้ ณ จุดเดียว อีกทั้งยังลดค่าใช้จ่ายที่เกิดจากการตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดทางโลหิตวิทยาใน dual platform รวมทั้งลดข้อจำกัดในกรณีที่มีเลือดผู้ติดเชื้อหรือผู้ป่วยมีเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (nucleated red blood cell, NRBC) ที่รบกวนการตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาว⁽⁵⁾ และข้อจำกัดในหลักการวิเคราะห์เซลล์ที่ต่างกันของเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดทางโลหิตวิทยาชนิดต่างๆ^(10,16) จากนโยบายสาธารณสุขของรัฐ สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ (สปสช) ให้การสนับสนุนค่าตรวจวินิจฉัยค่าตรวจติดตามการรักษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวีหรือผู้ป่วยเอดส์ โดยสนับสนุนค่าตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์ปีละ

2 ครั้ง ซึ่งจะเสียงบประมาณ 400 ล้านบาทต่อปี และ 4.2 ล้านบาทต่อปีสำหรับผู้มาใช้บริการตรวจ CD4 ทีลิมโฟไซต์ที่โรงพยาบาลสระบุรี จากค่าใช้จ่าย 500 บาทต่อการวิเคราะห์มีต้นทุน 90 บาทที่เกิดจากการใช้ fluorescent microbeads ดังนั้น หากสามารถลดต้นทุนในส่วนนี้จะทำให้ค่าการวิเคราะห์ผู้ติดเชื้อหรือผู้ป่วยที่มาตรวจวินิจฉัยและตรวจติดตามการรักษาที่ งานภูมิคุ้มกัน กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก ปีละ 2 ครั้ง จำนวนประมาณ 4,200 คน จะมีต้นทุนลดลงปีละ 756,000 บาท ($90 \times 2 \times 4,200$) หรือคิดเป็นงบประมาณที่ลดลง 18% ต้นทุนการวิเคราะห์ที่ลดลงช่วยลดค่าใช้จ่ายและรองรับการเข้าถึงการให้ยาต้านไวรัสกับผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยเอดส์ทุกคน ตามนโยบายการขยายเกณฑ์ให้ยาต้านไวรัสจากเดิมที่กำหนดให้ยาเมื่อ ค่าสัมบูรณ์ CD4 ทีลิมโฟไซต์ต้องต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร^(5,6) ขยายไปเป็น 350 เซลล์ต่อไมโครลิตรและในปี พ.ศ. 2559 ให้ผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยเอดส์ได้รับ ยาต้านไวรัสทุกคน อย่างไรก็ตามการใช้ fluorescent microbeads ยังมีความจำเป็นในกรณีที่จะทบทวนคุณภาพด้านความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์และการตรวจสอบ การสอบเทียบเครื่องวิเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Department of Disease Control. HIV prevention campaign “July 1 VCT Day” Thai people nearly 5 thousand people still do not know that they are infected. Accelerate the regulation for self-testing HIV. [Internet] Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health; June 23, 2016 [cited December 1, 2016]. Available from: <https://www.riskcomthai.org/th/news/mass-media-detail.php?id=33870>

2. National Health Security Office (NHSO). Fund management guide. National Health Security Fund, fiscal year 2015, Management of services for HIV/AIDS patients and management of tuberculosis patients. National Health Security Office. October, 2014.
3. Fahey JL, Taylor JMG, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, Giorgi JV. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type I .N Eng J Med 1990; 322: 166-72.
4. Ongwandee S., Lertpiriyasuwat C., Lolekha S., Sukkul A. Editors. Thailand National Guidelines on HIV/AIDS Treatment and Prevention 2014. Bureau of AIDS, TB and STIs, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. September, 2014.
5. Department of Health and Human Services (DHHS). Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. [Internet] Department of Health and Human Services. January 29, 2008; 1-128. [cited December 1, 2016]. Available from:<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. Morbid Mortal Wkly Rep. 1992; 41: 1-35.
7. Jourdain G., Le Coeur S., Ngo-Giang-Huong N., Traisathit P., Cressey TR., Fregonese F., et al. Switching HIV treatment in adults based on CD4 count versus viral load monitoring: A randomized, non-inferiority trial in Thailand. PLOS Medicine, 2013; 10 (8): e1001494
8. WHO. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings: treatment guidelines for a public health approach 2003. Revision Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004
9. NCCLS. Clinical application of flow cytometry: immuno-phenotyping of lymphocytes, approved guideline, National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 1998
10. Robinson G., Morgan L., Evans M., Mc Dermott S., Pereira S., Wansbrough-Jones M., et. al. Effect of type of haematology analyser on CD4 count. Lancet 1992; 26: 52-89.
11. Sirisali K., Vattanaviboon P., Manochiopinij S., Wonglumsom W., Sirisali S. The vital prerequisite of hematology laboratory quality control: know why & know how Bangkok H.T.P. press Ltd, May, 2012
12. Chairatanapiwong S., Siwamoke H., Singbootra P., Klangsinrikul P., Dettrairat S. Uncertainty value of %CD4+T cell measurement. Journal of Associated Medical Sciences, 2014; 47 (2): 112-117
13. White GH., Farrance I. *on behalf of the AACB. Uncertainty of Measurement Working Group. A Laboratory Implementation Guide Clin Biochem Rev* 2004; 25 Suppl (ii) November: S1-S24
14. The AIDS Infonet. CD4 (T cell) tests. [Internet] The AIDS Infonet.; 2010 [cited January 14, 2017]. Available from:<https://www.aids.org/2010/09/cd4-t-cell-tests/>

15. Wade D., Daneau G., Aboud S., Vercauteren GH., Urassa WSK., and Kestens L. WHO Multicenter Evaluation of FACSCount CD4 and Pima CD4 T-Cell Count Systems: Instrument Performance and Misclassification of HIV-Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014; 66(5): e98-e107.
16. Reilly JT, Barnett D. UK NEQAS for leucocyte immuno-phenotyping: the first 10 years. *J Clin Pathol* 2001; 54: 508-11.
17. Allan A.L. and Keeney M. Circulating tumor cell analysis: Technical and statistical considerations for application to the clinic. [Internet] *Journal of Oncology* 2010, Article ID 426218, Available from: [https://doi.org/ 10.1155/2010/426218](https://doi.org/10.1155/2010/426218)