

ค่าจำแนกที่ใช้ในการแยกผู้ป่วยติดเชื้อและไม่ติดเชื้อมาลาเรีย โดยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ

ศราวุธ ตุ่นคำแดง^{1,2}, ยุพิน อภิวงศตองกุล^{2*}, ณัฐยา แซ่ฮึง²

Received: June 1, 2012

Revised & Accepted: December 21, 2012

บทคัดย่อ

ปัจจุบัน เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ ได้รับการพัฒนาเทคโนโลยีให้มีศักยภาพในการวินิจฉัยโรคได้มากขึ้น โดยเทคโนโลยีหนึ่งที่ได้รับการพัฒนา คือ การวัดการเปลี่ยนแปลงขนาด (volume; V) สื่อนำกระแสไฟฟ้า (conductivity; C) และการกระจายแสงเลเซอร์ (scatter; S) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เรียกว่า เทคโนโลยี VCS ซึ่งแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของค่า V ค่า C และ ค่า S ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ มีผู้นำค่าพารามิเตอร์ VCS มาสร้างค่าจำแนกการติดเชื้อมาลาเรีย คือ ค่า D พบว่ามีประสิทธิภาพในการแยกผู้ติดเชื้อมาลาเรียออกจากคนปกติได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการประเมินประสิทธิภาพของค่าดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยที่มาพบแพทย์ด้วยอาการไข้มาก่อน คณะผู้วิจัย จึงได้ประเมินการใช้ค่า D ในการคัดกรองผู้ติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยที่มาพบแพทย์ด้วยอาการไข้และสงสัยว่าติดเชื้อมาลาเรียที่โรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก จำนวน 365 ราย ผู้ป่วยทุกรายได้รับการตรวจเลือดด้วยเครื่อง Beckman-Coulter® รุ่น LH 750 และตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจฟิล์มเลือดหนาและฟิล์มเลือดบาง ผลการศึกษา พบผู้ติดเชื้อมาลาเรีย 191 ราย (*P. falciparum* 112 รายและ *P. vivax* 79 ราย) และเป็นผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรีย 174 ราย เมื่อเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยา ระหว่างผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มพบว่า จำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดแดง จำนวนเกล็ดเลือด ปริมาณฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต และเกล็ดเลือด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจำนวนเกล็ดเลือด ซึ่งพบ $122.1 \pm 98.3 \times 10^9/L$ และ $282.6 \pm 102.4 \times 10^9/L$ ในกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียและกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรีย ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วยกราฟ ROC เพื่อหาค่า cut off ในการแยกกลุ่มผู้ติดเชื้อและผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรีย พบว่า ค่า $D > 4.71$ มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีค่าความไวร้อยละ 78.5 ค่าความจำเพาะร้อยละ 65.5 และค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.7969 อย่างไรก็ตาม เมื่อประเมินประสิทธิภาพการคัดกรองผู้ติดเชื้อมาลาเรียโดยใช้จำนวนเกล็ดเลือด พบว่า ค่าเกล็ดเลือดที่น้อยกว่า $150 \times 10^9/L$ ให้ค่าความไวร้อยละ 95.4 ค่าความจำเพาะร้อยละ 72.8 และค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.901 ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ค่าเกล็ดเลือดสามารถใช้คัดกรองผู้ติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการไข้ได้ดีกว่าค่า D และอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่อื่นที่มีการระบาดของมาลาเรียได้

คำสำคัญ: มาลาเรีย, พารามิเตอร์วีซีเอส, ค่าจำแนกการติดเชื้อมาลาเรีย, เกล็ดเลือด, เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ

¹บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²กลุ่มวิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Discriminant values for differentiation between malaria and non-malaria illness by hematology analyzer

Sarawut Toonkomdang^{1,2}, Yupin Aniwatangkoora² *, Nattaya Sae-ung²

Abstract

At present, technology of hematology analyzers has been improved. Of the advanced technologies, the VCS technology, the measurement of volume (V), conductivity (C) and light scatter (S), is introduced. Parameters obtained from this technology include mean and standard deviation (SD) for V, C, and S of each type of leukocytes. It has been demonstrated by some investigators that the discriminant factor (D) derived from these parameters can effectively discriminate malaria patients from normal individuals. However, information on its effectiveness for screening of malaria among febrile patients is not available. In order to assess the effectiveness of the D value, 365 febrile patients suspected for malaria infection attending medical care service at Phob Phra Hospital, Tak province, were recruited. All patients were investigated for hematological parameters using the Beckman Coulter® LH 750. Malaria was diagnosed according to the presence of malarial parasites on either thick or thin blood films. Of the 365 patients, 191 (52.3 %) were positive for malaria. Of these, 112 were positive for *P. falciparum*, and 79 were positive for *P. vivax*. Analysis of hematological parameters showed that white blood cell count, red blood cell count, platelet count, hemoglobin level, and hematocrit values in malaria-infected group were significantly lower than those of non-infected group ($P < 0.01$). A marked reduction of platelet count was observed in malaria-infected group, i.e $122.1 \pm 98.3 \times 10^9/l$ in malaria group, and $282.6 \pm 102.4 \times 10^9/l$ in non-infected group. Determination of appropriate cutoff using ROC curve analysis revealed that a D value > 4.71 provided the highest effectiveness with a sensitivity of 78.5 % and specificity of 65.5 % (AUC = 0.7969). Additional evaluation using platelet count < 150 as indicator, a better result was obtained with a sensitivity of 95.4 % and specificity of 72.8 % (AUC = 0.901). The findings indicate that platelet is an effective indicator for screening of malaria among febrile patients, and might be applicable to other endemic areas for malaria.

Keywords: Malaria, VCS parameter, Malaria discriminant factor, Platelet, Hematology analyzer

¹ Graduate School, Khon Kean University.

² Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

* Corresponding author: (e-mail: yupani@kku.ac.th)

บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อประชากรที่อาศัยอยู่ในแถบเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนซึ่งมีรายงานว่าร้อยละ 40 ของประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดของมาลาเรียมีผู้ป่วยประมาณ 300-500 ล้านคนที่ติดเชื้อและ 1.5-2.7 ล้านคนที่เสียชีวิตจากมาลาเรียต่อปี⁽¹⁾ สาเหตุของเชื้อมาลาเรียที่อาจทำให้เกิดความรุนแรงและมีภาวะแทรกซ้อนจนถึงขั้นเสียชีวิตส่วนใหญ่เกิดจาก *P. falciparum* เช่น มาลาเรียขึ้นสมอง แต่มีบางรายงานพบว่า เชื้อมาลาเรียขึ้นสมอง อาจเกิดจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. malariae*⁽²⁾ จากสรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคของสำนักงานโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2551 พบว่ามีผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 28,902 คน คิดเป็นอัตราป่วย 45.72 ต่อแสนประชากร และมีผู้เสียชีวิต 36 คน คิดเป็นอัตราป่วยตายร้อยละ 0.12 ซึ่งในจังหวัดตากมีอัตราป่วยสูงอันดับแรกของประเทศ⁽³⁾ และที่อำเภอพบพระมีการระบาดของเชื้อมาลาเรียตลอดทั้งปี ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียที่รวดเร็วและมีผลการตรวจที่ถูกต้อง จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการดูแลผู้ป่วย การวางแผนการรักษา และการเฝ้าระวังภาวะแทรกซ้อนที่อาจก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียที่ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน คือการตรวจฟิล์มเลือดหนา (thick film) และฟิล์มเลือดบาง (thin film) ด้วยกล้องจุลทรรศน์⁽⁴⁾ แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากใช้เวลานานและต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ในการตรวจ นอกจากนั้นในกรณีที่มีการติดเชื้อที่มีปริมาณต่ำอาจตรวจไม่พบ ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจเชื้อมาลาเรียให้ได้เร็วและง่ายขึ้น ได้แก่ การนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)⁽⁵⁾ มาใช้ในการตรวจแยกมาลาเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่ามีค่าไวสูงแต่มีขั้นตอนยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เหมาะกับการใช้ในงานประจำวัน การตรวจด้วยวิธีการวัดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent method) หรือ quantitative buffy coat (QBC)^(6,7) และการตรวจด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกัน⁽⁸⁾ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวใกล้เคียงกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แต่มีค่าใช้จ่ายสูงเช่นกัน

ปัจจุบันบริษัท Beckman Coulter ได้พัฒนาเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติในการวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้เทคโนโลยี VCS ซึ่งวัดขนาดของเซลล์ (volume; V) โดยการวัดความต้านทานไฟฟ้า (electrical impedance) วัดขนาดของนิวเคลียสและอัตราส่วนระหว่างนิวเคลียสต่อ

ไซโตพลาสซึมโดยการวัดความเป็นสื่อกระแสไฟฟ้าของเซลล์ในสนามไฟฟ้า (conductivity; C) และวัดคุณสมบัติในการกระจายแสงเลเซอร์ของเซลล์ (scatter; S) เพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับรูปร่างของนิวเคลียส ขนาด พื้นที่ผิวเซลล์ ความหนาแน่นและแกรนูลที่อยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาว ในการตรวจวัดเซลล์เม็ดเลือดขาว และรายงานค่าเฉลี่ย (mean) ของพารามิเตอร์ VCS และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard deviation; SD) ของพารามิเตอร์ VCS ของเซลล์แต่ละชนิด เช่น เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล (neutrophil; N) มีพารามิเตอร์ VCS คือ ค่าเฉลี่ยขนาดของนิวโตรฟิล (mean neutrophil volume; MNV) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยขนาดของนิวโตรฟิล (SD of mean neutrophil volume; SD-MNV) ค่าเฉลี่ยการนำไฟฟ้าของนิวโตรฟิล (mean neutrophil conductivity; MNC) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยการนำไฟฟ้าของนิวโตรฟิล (SD of mean neutrophil conductivity; SD-MNC) ค่าเฉลี่ยการกระจายแสงของนิวโตรฟิล (mean neutrophil scatter; MNS) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยการกระจายแสงของนิวโตรฟิล (SD of mean neutrophil scatter; SD-MNS) ในลักษณะเดียวกันค่าพารามิเตอร์ VCS ของลิมโฟไซต์ (lymphocyte; L) คือ MLV, SD-MLV, MLC, SD-MLC, MLS, SD-MLS ตามลำดับ และค่าพารามิเตอร์ VCS ของโมโนไซต์ (monocyte; Mo) คือ MMoV, SD-MMoV, MMoC, SD-MMoC, MMoS, SD-MMoS ตามลำดับ ที่ผ่านมา ได้มีผู้นำค่าพารามิเตอร์ VCS สร้างสูตรคำนวณเพื่อแยกแยะระหว่างผู้ติดเชื้อมาลาเรียและคนปกติ เรียกว่า ค่า malaria discriminant factor (D) หรือค่าจำแนกมาลาเรีย⁽⁹⁾ ซึ่งพบว่าค่า $D > 5.06$ สามารถแยกผู้ติดเชื้อมาลาเรียออกจากคนปกติได้ โดยมีค่าความไวร้อยละ 96.9 และค่าความจำเพาะร้อยละ 82.5⁽⁹⁾ นอกจากนั้น ยังมีการศึกษาที่จำแนกผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียออกจากสาเหตุอื่นๆ โดยใช้ค่า $D > 3.7$ เป็นค่า cut off พบว่า มีค่าความไวและค่าความจำเพาะสูงขึ้นคือ ร้อยละ 98 และร้อยละ 94 ตามลำดับ⁽¹⁰⁾ อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการศึกษาที่ใช้ผู้ที่มีสุขภาพดีเป็นกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับผู้ป่วยมาลาเรียและยังไม่มีการศึกษาที่ใช้ค่า D สำหรับใช้แยกผู้ป่วยมาลาเรียที่มีไข้กับผู้ป่วยที่มีไข้เนื่องจากสาเหตุอื่น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้ค่า D ที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Beckman Coulter® LH 750 ในการคัดกรอง

ผู้ป่วยที่มีไข้จากการติดเชื้อมาลาเรียออกจากผู้ป่วยที่มีไข้จากสาเหตุอื่น และเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม

วัสดุและวิธีการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาย้อนหลัง โดยศึกษาข้อมูลของผู้ป่วยจากบันทึกในเวชระเบียนที่โรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 โดยเกณฑ์ของผู้ป่วยที่เลือกมาศึกษา คือ เป็นผู้ป่วยซึ่งมีไข้มากกว่าหรือเท่ากับ 38 องศาเซลเซียส มีประวัติเป็นไข้ก่อนมาโรงพยาบาล 2 วัน มีอาการไข้หนาวสั่น และ/หรือ แพทย์สั่งตรวจมาลาเรีย โดยมีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้

1. เก็บข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ และผลการวินิจฉัยโรคโดยแพทย์
2. เก็บข้อมูลทางโลหิตวิทยาของตัวอย่างเลือดที่ตรวจได้จากเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Beckman Coulter® LH 750 ได้แก่ WBC count, % Neutrophil, % Lymphocyte, % Monocyte, % Eosinophil, % Basophil, RBC count, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW และ platelet count
3. เก็บข้อมูลค่าพารามิเตอร์ VCS ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ตรวจได้จากเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Beckman Coulter® LH 750 โดยนิวโทรฟิล ได้แก่ MNV, SD-MNV, MNC, SD-MNC, MNS, SD-MNS ลิมโฟไซต์ ได้แก่ MLV, SD-MLV, MLC, SD-MLC, MLS, SD-MLS และโมโนไซต์ ได้แก่ MMoV, SD-MMoV, MMoC, SD-MMoC, MMoS, SD-MMoS
4. เก็บข้อมูลผลการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียซึ่งข้อมูลนี้เป็นผลการรายงานการติดเชื้อมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ตรวจจากตัวอย่างเลือดที่ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งและถูกนำไปตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียด้วยการทำฟิล์มเลือดหนาและฟิล์มเลือดบางตามวิธีมาตรฐาน⁽¹¹⁾
5. ประเมินประสิทธิภาพค่า D ต่อการคัดกรองผู้ติดเชื้อมาลาเรีย โดยคำนวณค่า D จากสูตรที่เสนอโดย Fourcade C, et al. ⁽⁹⁾ ดังนี้

$$D = \frac{V_{SD} \text{ (Lymphocyte)} \times V_{SD} \text{ (Monocyte)}}{100}$$

เมื่อ D คือ ค่าจำแนกการติดเชื้อมาลาเรีย

V_{SD} (Lymphocyte) คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยขนาดของลิมโฟไซต์

V_{SD} (Monocyte) คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยขนาดของโมโนไซต์

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยคำนวณร้อยละของผู้ติดเชื้อและผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรียโดยจำแนกตามเพศเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลแจกแจง (เพศ) ด้วยสถิติ Chi-square และข้อมูลต่อเนื่อง ได้แก่ อายุ ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและพารามิเตอร์ VCS ของนิวโทรฟิล ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อและไม่ติดเชื้อมาลาเรีย โดยใช้สถิติ Mann-Whitney-U test กำหนดนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $P\text{-value} < 0.05$ และประเมินประสิทธิภาพ และหาค่า cut off โดยใช้ receiver operating characteristic curve (ROC)

ผลการศึกษา

1. ข้อมูลพื้นฐานและค่าทางโลหิตวิทยาในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย และผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรีย

จากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 365 ราย แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย 191 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.32 พบเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ร้อยละ 30.68 และชนิด *P. vivax* ร้อยละ 21.64 กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อมาลาเรียจำนวน 174 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.68 ซึ่งมีสาเหตุของการเจ็บป่วย ได้แก่ การติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบน 51 ราย (ร้อยละ 13.97) คออักเสบ 32 ราย (ร้อยละ 8.77) ไข้เฉียบพลัน 29 ราย (ร้อยละ 7.95) ไข้หวัด 26 ราย (ร้อยละ 7.12) หลอดลมอักเสบ 12 ราย (ร้อยละ 3.29) ปอดอักเสบ 8 ราย (ร้อยละ 2.19) ไข้ไม่ทราบสาเหตุ 5 ราย (ร้อยละ 1.37) ติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ 3 ราย (ร้อยละ 0.82) ติดเชื้อโรคเขตร้อน 3 ราย (ร้อยละ 0.82) ไข้หวัดใหญ่ 3 ราย (ร้อยละ 0.82) และภาวะช้ำจากไข้ 2 ราย (ร้อยละ 0.55) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราการตรวจพบผู้ติดเชื้อมาลาเรียและผลการวินิจฉัยในกลุ่มตัวอย่าง

Diagnosis	Number	%
Malaria infection	191	52.32
<i>P. falciparum</i>	112	30.68
<i>P. vivax</i>	79	21.64
Non-malaria infection	174	47.68
Upper respiratory infection	51	13.97
Pharyngitis	32	8.77
Acute febrile illness	29	7.95
Common cold	26	7.12
Bronchitis	12	3.29
Pneumonia	8	2.19
Fever of unknown origin	5	1.37
Urinary tract infection	3	0.82
Tropical infection	3	0.82
Influenza	3	0.82
Febrile convulsion	2	0.55
Total	365	100.00

จากข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างพบว่า ผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียมีอายุและเพศแตกต่างจากผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรียอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า *P*-value เท่ากับ 0.006 และ 0.022 ตามลำดับ นอกจากนี้กลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียและกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อ

มาลาเรียยังมีค่าทางโลหิตวิทยาที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีโมโกลบิน ค่าฮีมาโตคริต จำนวนเกล็ดเลือด ร้อยละของนิวโตรฟิล ลิมโฟไซต์และอีโอซิโนฟิล (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานและค่าทางโลหิตวิทยาในผู้ติดเชื้อมาลาเรียและไม่ติดเชื้อมาลาเรีย

Characteristics/ Hematological parameters	Malaria	Non malaria	P - value
Number	191	174	
Age (year)	31.1 ± 13.6	26.4 ± 14.9	0.006
Sex			0.022
Male (%)	115 (60.2)	84 (48.3)	
Female (%)	76 (39.8)	90 (51.7)	
WBC count (x10 ⁹ /L)	6.9 ± 2.7	10.0 ± 4.6	0.001
Neutrophil (%)	68.1 ± 16.1	60.6 ± 17.6	0.001
Lymphocyte (%)	20.9 ± 12.4	28.1 ± 15.3	0.001
Monocyte (%)	8.7 ± 5.7	7.86 ± 4.4	0.101
Eosinophil (%)	1.8 ± 2.5	2.8 ± 3.3	0.001
Basophil (%)	0.6 ± 1.0	0.6 ± 1.7	0.841
RBC count (x10 ¹² /L)	4.3 ± 3.0	4.6 ± 0.7	0.001
Hb (g/dL)	11.3 ± 2.5	12.0 ± 2.2	0.002
HCT (%)	34.5 ± 7.3	37.0 ± 6.3	0.001
MCV (fL)	81.3 ± 9.3	80.4 ± 10.2	0.199
MCH (pg)	26.6 ± 4.4	26.2 ± 3.9	0.231
MCHC (%)	32.5 ± 1.8	32.5 ± 1.1	0.637
RDW (%)	15.6 ± 2.7	15.3 ± 3.0	0.266
Plt count (x10 ⁹ /L)	122.1 ± 98.3	282.6 ± 102.4	0.001

2. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าพารามิเตอร์ VCS

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ VCS ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียและกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรียพบ

ว่า ค่าเฉลี่ย MNV, SD-MNV, SD-MNC, MNS, MLC, SD-MLV, SD-MLC, SD-MLS, MMoV, SD-MMoV, SD-MMoC, แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า $P < 0.001$ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยพารามิเตอร์ VCS ของเม็ดเลือดขาวในผู้ติดเชื้อมาลาเรียและไม่ติดเชื้อมาลาเรีย

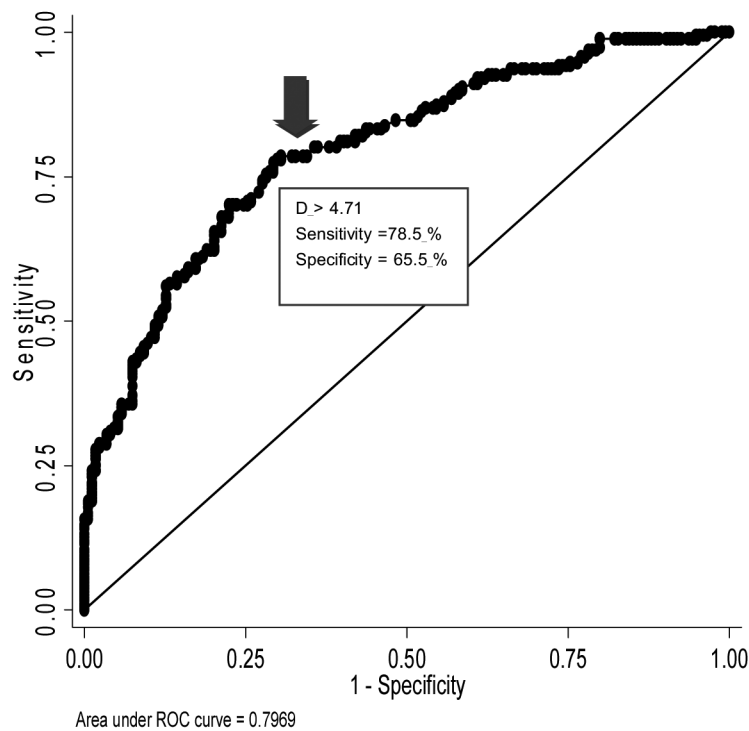
	Mean			SD		
	Volume	Conductivity	Scatter	Volume	Conductivity	Scatter
Neutrophil						
Malaria	157.2 ± 12.9	157.1 ± 10.1	137.7 ± 9.4	27.5 ± 5.1	10.7 ± 3.3	12.9 ± 2.6
Non malaria	150.5 ± 10.1	158.3 ± 13.5	144.0 ± 29.8	24.6 ± 3.8	8.8 ± 2.7	12.5 ± 2.5
P- value *	< 0.001	0.422	0.005	< 0.001	< 0.001	0.130
Lymphocyte						
Malaria	79.4 ± 13.0	133.1 ± 13.5	71.1 ± 7.1	21.8 ± 4.2	23.2 ± 6.8	20.2 ± 3.0
Non malaria	80.3 ± 8.6	128.1 ± 10.0	69.9 ± 6.1	19.4 ± 3.7	18.2 ± 5.2	18.9 ± 2.0
P- value *	0.512	< 0.001	0.043	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Monocyte						
Malaria	188.3 ± 13.2	135.8 ± 8.5	91.6 ± 5.4	26.4 ± 4.6	8.1 ± 2.4	11.0 ± 6.3
Non malaria	178.1 ± 12.5	135.3 ± 8.2	92.1 ± 5.0	22.2 ± 3.0	7.0 ± 3.6	10.5 ± 1.3
P- value *	< 0.001	0.276	0.778	< 0.001	< 0.001	0.408

* Mann – Whitney – U test

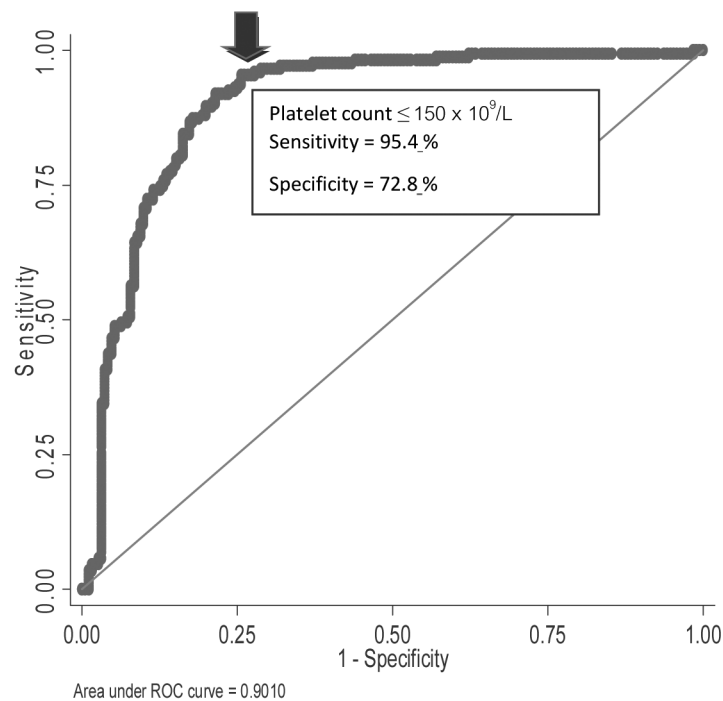
3. ประสิทธิภาพของการใช้ค่า D และจำนวนเกล็ดเลือดในการจำแนกผู้ติดเชื้อมาลาเรีย

จากการวิเคราะห์ค่า D และจำนวนเกล็ดเลือด ในการจำแนกผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียออกจากผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อมาลาเรียด้วยการวิเคราะห์กราฟ ROC พบว่า การใช้ค่า

D ที่ > 4.71 มีค่าความไวร้อยละ 78.5 ค่าความจำเพาะร้อยละ 65.5 และค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.7969 (รูปที่ 1) ส่วนการใช้จำนวนเกล็ดเลือด < 150×10⁹/L มีค่าความไวร้อยละ 95.4 ค่าความจำเพาะร้อยละ 72.8 และค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.9010 (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 กราฟ ROC ของการใช้ค่า malaria discriminant factor (D) ในการจำแนกผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยที่มาพบแพทย์ด้วยอาการไข้



รูปที่ 2 กราฟ ROC ของการใช้จำนวนเกล็ดเลือด (platelet count) ในการจำแนกผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย ในกลุ่มผู้ป่วยที่มาพบแพทย์ด้วยอาการไข้

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ประเมินประสิทธิภาพของการใช้ค่าจำแนกการติดเชื้อมาลาเรียหรือค่า D ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นไข้และติดเชื้อมาลาเรียและผู้ป่วยที่เป็นไข้แต่ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรีย ซึ่งพบว่าลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันคือกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียมีอายุสูงกว่าและพบในเพศชายมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อมาลาเรีย (ตารางที่ 2) ทั้งนี้เนื่องจากผู้ติดเชื้อมาลาเรียเป็นกลุ่มวัยแรงงานที่ทำนาทำไร่ตามสภาพพื้นที่ชายแดนจึงมีโอกาสนในการติดเชื้อได้มากกว่าวัยอื่นๆ ส่วนค่าทางโลหิตวิทยานั้นพบว่า จำนวนเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลและโมโนไซต์ จำนวนร้อยละของลิมโฟไซต์และร้อยละของอีโอซิโนฟิล ระหว่างทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าร้อยละของนิวโทรฟิลในกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญซึ่งผลนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าโลหิตวิทยาในเด็กที่ติดเชื้อมาลาเรีย⁽¹²⁾ แต่ร้อยละของโมโนไซต์ที่ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งได้ผลต่างจากผลการศึกษาโดย Maina RN, et al⁽¹²⁾ ซึ่งพบว่าค่าลิมบูร์นของโมโนไซต์ในกลุ่มเด็กติดเชื้อสูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากโมโนไซต์ถูกกระตุ้น เพิ่มจำนวนเพื่อ ทำลายเกล็ดเลือดที่ผิดปกติ นอกจากนั้นยังพบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีโมโกลบิน ค่าฮีมาโตคริตและจำนวนเกล็ดเลือดในกลุ่มที่เป็นไข้จากการติดเชื้อมาลาเรียมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่เป็นไข้จากสาเหตุอื่นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ในผู้ติดเชื้อมาลาเรียจะมีจำนวนของเม็ดเลือดขาวลดลง⁽¹³⁻¹⁵⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเม็ดเลือดขาวในกลุ่มควบคุมที่เป็นไข้แต่ไม่พบเชื้อมาลาเรีย^(13,14) และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิง⁽¹⁵⁾ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาอื่นที่พบจำนวนเม็ดเลือดขาวที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิง⁽¹⁶⁾ และกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อ⁽¹⁷⁾ ส่วนภาวะที่มีเกล็ดเลือดต่ำกว่า $150 \times 10^9 / L$ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในผู้ติดเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบกับผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรียนั้น เกิดจากการที่เกล็ดเลือดมีโครงสร้างเปลี่ยนไปและถูกทำลายโดยม้ามมากกว่าปกติ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ กลไกที่ทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำในผู้ป่วยมาลาเรียแม้จะยังไม่ทราบแน่ชัดแต่เชื่อได้ว่าไม่ใช่มีสาเหตุมาจากการกดการสร้างในไขกระดูกเพราะในไขกระดูกของผู้ติดเชื้อมาลาเรีย พบปริมาณ platelet forming megakaryocytes มีจำนวนปกติและ/หรือเพิ่มขึ้น ดังนั้นภาวะเกล็ดเลือดต่ำอาจเกิดจากเกล็ดเลือดถูกทำลายในม้ามโดยกลไกทางภูมิคุ้ม

เนื่องจากพบปริมาณของ IgG ที่จับกับเกล็ดเลือดมีเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อ⁽¹⁸⁾

การตรวจพบภาวะเกล็ดเลือดต่ำในผู้มีอาการไข้นอกจากมีสาเหตุจากการติดเชื้อมาลาเรียแล้วยังเกิดได้จากการติดเชื้อ HIV, Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus และ Dengue virus ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลจากพิษของไวรัสกดการสร้างเกล็ดเลือดในไขกระดูก⁽¹⁹⁾ ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มผู้เป็นไข้แต่ไม่ติดเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย การติดเชื้อเฉพาะที่ สำหรับผู้เป็นไข้ที่ติดเชื้อไวรัส (common cold, influenza) นั้นไม่อยู่ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV, CMV, Epstein-Barr virus และ Dengue virus จึงไม่พบภาวะเกล็ดเลือดต่ำในกลุ่มผู้ที่เป็นไข้แต่ไม่ติดเชื้อมาลาเรีย (ตารางที่ 2)

ผลการศึกษาพารามิเตอร์ VCS ที่พบว่าค่าเฉลี่ย MNV, SD-MNV, MMoV, SD-MMoV และค่า SD-MNC และ SD-MMoC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียและกลุ่มผู้เป็นไข้แต่ไม่ติดเชื้อมาลาเรีย (ตารางที่ 3) บ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาดและลักษณะโครงสร้างภายในของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและโมโนไซต์ขณะที่มีการติดเชื้อมาลาเรีย ซึ่งน่าจะเป็นผลจากกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) โดยตอบสนองต่อฮีโมซิน (hemozoin) ที่เชื้อมาลาเรียขับออกมา ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดช่องว่างในเซลล์ (vacuolization)⁽²⁰⁻²³⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดย el-Shoura SM, et al.⁽²⁴⁾ ที่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเม็ดเลือดขาวหลายชนิดในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย กล่าวคือ พบลักษณะเป็นปุ่ม (knob) ยื่นออกที่ผิวของนิวโทรฟิลและโปรมัยอีโรไซต์ พบช่องว่างในไซโตพลาซึมของโมโนไซต์ และนิวเคลียสของบิลิมโฟไซต์ที่มีการเปลี่ยนแปลง อีกทั้งพบว่าพลาสมาเซลล์ตัวอ่อน (plasmablast) มีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่โตคอนเดรีย การเปลี่ยนแปลงในรูปลักษณะดังกล่าวเข้าใจว่าเกิดจากสารพิษจากเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum*

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบอีกว่าค่า cut off ของค่า D ที่บ่งชี้ว่าติดเชื้อมาลาเรียคือ ค่าที่สูงกว่า 4.71 นั้นมีความไวร้อยละ 78.5 ค่าความจำเพาะร้อยละ 65.5 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 73.9 ค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 74.7 และค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.7969 ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาที่ผ่านมา^(9,10) ทั้งนี้เพราะการศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่ม

ผู้ที่เป็นไข้มาลาเรียกับผู้ที่เป็นไข้จากสาเหตุอื่น ซึ่งส่วนใหญ่ของผู้ป่วยกลุ่มนี้เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 1) ทำให้เม็ดเลือดขาวมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายด้วยเช่นกัน จึงส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chaves F, et al. ⁽²⁵⁾ ที่พบว่า ค่าเฉลี่ยของ MNV และ MNS ในผู้ติดเชื้อแบคทีเรียมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

อย่างไรก็ตาม เมื่อประเมินการใช้ค่าเกล็ดเลือดที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ $150 \times 10^9 / L$ พบว่า ให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่าการใช้ค่า D มาก โดยมีค่าความไวร้อยละ 95.4 ค่าความจำเพาะร้อยละ 72.8 และค่าพื้นที่ใต้กราฟ 0.9010 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 73.7 และค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 95.6 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Maina et al ⁽¹²⁾ ที่ได้ศึกษาในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อมาลาเรียในแถบตะวันตกของเคนยาซึ่งเป็นแหล่งระบาดของมาลาเรีย โดยพบว่าเด็กที่ติดเชื้อมาลาเรียและมีจำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่า $150 \times 10^9 / L$ มีโอกาสเป็นผู้ติดเชื้อมาลาเรียมากกว่ากลุ่มควบคุม 13.8 เท่า และให้ค่าความไวร้อยละ 90 ความจำเพาะร้อยละ 61 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 69 ค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 86 นอกจากนี้ยังพบว่าค่าสัมบูรณ์ของจำนวนโมโนไซต์และนิวโทรฟิลในกลุ่มเด็กที่ติดเชื้อมาลาเรียสูงกว่าที่พบในกลุ่มไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงถึงการตอบสนองของโมโนไซต์และนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อมาลาเรีย เช่นเดียวกับผลการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา โดย Erhart LM, et al. ⁽¹³⁾ ซึ่งพบว่าในแหล่งที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียผู้ที่มีค่าจำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่า $150 \times 10^9 / L$ มีโอกาสเป็นมาลาเรียมากกว่า 12-15 เท่าของผู้ที่มีค่าจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า $150 \times 10^9 / L$

การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า ค่าจำนวนเกล็ดเลือดที่น้อยกว่า $150 \times 10^9 / L$ สามารถใช้คัดกรองผู้ติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการไข้ได้ดีกว่าค่า D และอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ ในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอบพระคุณนายแพทย์ ศักดิ์บัญชา สมชัยมงคล ผู้อำนวยการโรงพยาบาลพบพระ จังหวัดตาก ที่อนุญาตให้ดำเนินการวิจัยในโรงพยาบาล

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Implementation of collaborative activities on roll back malaria in the South-East Asia region. Report of an intercountry meeting New Delhi, 4-6 May 1999; 2000: 1-21.
2. Mishra SK, Mohanty S. Clinical presentations of severe and complicated malaria in India. J Indian Acad Clin Med 2001; 2: 125-7.
3. Ponsing P. Malaria. Annual Epidemiological Surveillance Report [serial online] 2008; 23: 122-4.
4. Shute PG. An improved technique for staining blood films with Giemsa stain. Nature 1955; 175: 727.
5. Wongsrichanalai C, Pornsilapatip J, Namsiripongpun V, Webster HK, Luccini A, Pansamdang P. Acridine orange fluorescent microscopy and the detection of malaria in populations with low-density parasitemia. Am J Trop Med Hyg 1991; 44: 17-20.
6. Rickman LS, Long GW, Oberst R, Cabanban A, Sangalang R, Smith JJ, et al. Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. Lancet 1989; 1: 68-71.
7. Gillespie SH, Chiodini P. Is serology helpful in the diagnosis of malaria. Sero Immun Infect Dis 1988; 2: 157-60.
8. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol 1993; 58: 283-92.
9. Fourcade C, Casbas MJ, Belaouni H, Gonzalez JJ, Garcia PJ, Pepio MA. Automated detection of malaria by means of the haematology analyser Coulter® GEN.S™. Clin Lab Haematol 2004; 26: 367-72.
10. Briggs C, Da Costa A, Freeman L, Aucamp I, Ngubeni B, Machin SJ. Development of an

- automated malaria discriminant factor using VCS technology. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 691-8.
11. World Health Organization. Basic Malaria Microscopy. Part I. Learner's Guide. World Health Organization, Geneva (Switzerland), 1991.
 12. Maina RN, Walsh D, Gaddy C, Hongo G, Waitumbi J, Otieno L, et al. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malar J* 2010; 9 (suppl 3): 1-11.
 13. Erhart LM, Yingyuen K, Chuanak N, Buathong N, Laoboonchai A, Miller RS, et al. Hematologic and clinical indices of malaria in a semi-immune population of western Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70: 8-14.
 14. Lathia TB, Joshi R. Can hematological parameters discriminate malaria from nonmalarious acute febrile illness in the tropics? *Indian J Med Sci* 2004; 58: 239-44.
 15. Beale PJ, Cormack JD, Oldrey TB. Thrombocytopenia in malaria with immunoglobulin (IgM) changes. *Br Med J* 1972; 1: 345-9.
 16. Adedapo AD, Falade CO, Kotila RT, Ademowo GO. Age as a risk factor for thrombocytopenia and anaemia in children treated for acute uncomplicated falciparum malaria. *J Vector Borne Dis* 2007; 44: 266-71.
 17. Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K, Newton CR. Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. *Br J Haematol* 2002; 119: 839-47.
 18. Facer CA. Hematological aspects of malaria. In: *Infection and Hematology*. Oxford: Butterworth Heinmann Ltd., 1994: 259-94
 19. Sekhon SS, Roy V. Thrombocytopenia in adults: A practical approach to evaluation and management. *South Med J* 2006; 99: 491-98
 20. Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Ketiku O, Gbadegehin RA. Intraleucocytic malaria pigment in asymptomatic and uncomplicated malaria. *East Afr Med J* 1997; 74: 714-6.
 21. Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Gbadegehin RA. Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 54-6.
 22. Arese P, Schwarzer E. Malaria pigment (haemozoin): a very active "inert" substance. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91: 510-16.
 23. Dasari P, Reiss K, Lingelbach K, Baumeister S, Lucius R, Udomsangpetch R, et al. Digestive vacuoles of *Plasmodium falciparum* are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 2011; 118: 4946-56.
 24. el-Shoura SM. Falciparum malaria in naturally infected human patients: IV-Ultrastructural changes in peripheral white blood cells. *Ann Parasitol Hum Comp* 1993; 68: 169-75.
 25. Chaves F, Tierno B, Xu D. Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer: new and reliable indicators for acute bacterial infection. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 440-4.