

Comparison of Red Blood Cell Parameter on UF-5000 Automated Urine Sediment Analyzer with DRBC by Phase Contrast Microscope

Natsuda Fungpia, Mongkol Kunakorn, Anuchat Uamkhyan,
Rommanee Khositnithikul, Sirinthon Songngam,
Benjawan Ouima and Rawadee Komvisut*

*Clinical Microscopy Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Abstract

Phase contrast microscope (PCM) analysis of red blood cells (RBCs) in urinalysis is used to determine the cause of hematuria. Identifying dysmorphic red blood cells (DRBCs) in urine indicates that the RBCs are leaked from the nephron's glomerulus. However classification of urine DRBCs by PCM is time-consuming and requires expertise. Clinical laboratories usually employ fully automated instruments for routine urinalysis. UF-5000 is an automated urinalysis instrument based on fluorescence flow cytometry providing RBCs information. In this study, we compared the RBC parameters of UF-5000; UF-%sRBCs, UF-small RBC/large RBC, UF-small RBC, UF-large RBC, UF-NL RBC, UF-lysed RBC, UF-RBC-P70Fsc, and UF-RBC-Fsc-DW with the identification of DRBCs by PCM using the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The results revealed that the area under the curve (AUC) of the UF-small RBC, UF-RBC-Fsc-DW, UF-lysed RBC, and UF-NL RBC were statistically significant ($p < 0.005$) for detection of DRBCs. The UF-small RBC showed the largest AUC at 0.667, with a sensitivity of 60.22%, a specificity of 67.31%, a PPV of 45.2%, and an NPV of 79.1% at the cut off $> 53.5/\mu\text{L}$. In addition, the UF5000 also provides a UF-flag (RBC : mixed?, RBC : dysmorphic?) having a sensitivity of 91.40% and specificity of 26.92%. Combining the UF-small RBC parameter and the UF-DRBCs flag resulted in the sensitivity and specificity of 96.15% and 43.48%, respectively. In conclusion, a fully automated urine analyzer is a reduced workload and time-saving alternative for clinical laboratory identification of urine DRBCs.

Keywords: Red blood cell, Dysmorphic red blood cell, Glomerulonephritis, UF-5000, Phase contrast microscope

*Corresponding author E-mail address: umean.rayda@gmail.com

Received: 11 July 2022

Revised: 21 October 2022

Accepted: 15 November 2022

การเปรียบเทียบเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของเครื่องตรวจ ตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติ UF-5000 กับการตรวจพบ DRBC ด้วย Phase Contrast Microscope

ณัฐสุดา ฟุ้งเปี้ย มงคล คุณากร อนุชาติ อ่วมขยัน รมณีย์ โฆษิตนิกุล สิริรินทร์ ทรงงาม
เบญจวรรณ อู่ยมา และ เรวดี คำวิสุทธิ*

ห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การตรวจหา dysmorphic red blood cell (DRBC) เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วย glomerulonephritis (GN) ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast (PCM) ซึ่งต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้ ความชำนาญ อีกทั้งใช้เวลานาน เครื่องตรวจตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติเป็นทางเลือกในการช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการรายงานผล ลดภาระงานได้ โดยเครื่อง UF-5000 ที่ใช้หลักการ fluorescence flow cytometry สามารถรายงานเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ได้หลากหลาย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของเครื่อง UF-5000 คือ UF-%sRBCs, UF-small RBC/large RBC, UF-small RBC, UF-large RBC, UF-NL RBC, UF-lysed RBC, UF-RBC-P70Fsc และ UF-RBC-Fsc-DW กับการตรวจพบ DRBC ด้วยกล้อง PCM โดยใช้ receiver operating characteristic (ROC) curve ในการวิเคราะห์ค่า AUC พบว่าเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ที่ได้จากเครื่อง UF-5000 ช่วยในการคัดกรอง DRBC ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือ UF-small RBC, UF-RBC-Fsc-DW, UF-lysed RBC และ UF-NL RBC โดยที่ UF-small RBC (cut off $> 53.5/\mu\text{L}$) เป็นพารามิเตอร์ที่ดีที่สุด มีค่า AUC สูงที่สุด เท่ากับ 0.667, ค่าความไวร้อยละ 60.22, ค่าความจำเพาะร้อยละ 67.31, PPV ร้อยละ 45.2, NPV ร้อยละ 79.1 นอกจากนี้ยังได้ศึกษา UF-flag (RBC : mixed?, RBC : dysmorphic?) จากเครื่อง UF-5000 พบค่าความไวร้อยละ 91.40, ค่าความจำเพาะร้อยละ 26.92 และเมื่อนำ UF-small RBC ไปพิจารณาพร้อมกับ UF-flag มีค่าความไวและค่าความจำเพาะดีที่สุดคือร้อยละ 96.15 และร้อยละ 43.48 ตามลำดับ เครื่องตรวจตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติเป็นทางเลือกหนึ่ง ที่ช่วยลดภาระงานในห้องปฏิบัติการได้ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่มีปริมาณงานมาก โดยให้ความสำคัญ และตระหนักในการตรวจหา DRBC ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในรายที่เครื่องแสดงสัญญาณเตือน

คำสำคัญ: เม็ดเลือดแดง, Dysmorphic red blood cell, Glomerulonephritis, UF-5000, กล้องจุลทรรศน์ phase contrast

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: umean.rayda@gmail.com

รับบทความ: 11 กรกฎาคม 2565

แก้ไขบทความ: 21 ตุลาคม 2565

รับตีพิมพ์บทความ: 15 พฤศจิกายน 2565

บทนำ

ภาวะที่ผู้ป่วยมีเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะ (hematuria) ถือว่ามีความสำคัญทางคลินิกเพราะอาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งหรือโรคไตได้ ในปี พ.ศ. 2025 Fairly และ Birch ได้ศึกษาความแตกต่างของรูปร่างเม็ดเลือดแดงจากแหล่งที่มาของเม็ดเลือดแดงที่พบในปัสสาวะ พบว่าในผู้ป่วยโรคโกลเมอรูลัสเม็ดเลือดแดงที่พบมีรูปร่างบิดเบี้ยว เรียกว่า dysmorphic red blood cell (DRBC) ในขณะที่เม็ดเลือดแดงที่หลุดมาจากตำแหน่งอื่นของทางเดินปัสสาวะ (urologic hematuria) จะมีรูปร่างปกติและรูปแบบเซลล์เหมือน ๆ กัน⁽¹⁾

การพบ DRBC ในปัสสาวะเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีเม็ดเลือดแดงหลุดมาจากส่วนของโกลเมอรูลัส (glomerular hematuria) ซึ่งเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคในผู้ป่วย glomerulonephritis (GN)⁽²⁾ จากการศึกษาพบว่ามีหลายปัจจัยที่เป็นสาเหตุทำให้เม็ดเลือดแดงถูกเปลี่ยนรูปไปเป็น DRBC ปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ การลอดตัวของเม็ดเลือดแดงผ่าน glomerular basement membrane ที่ผิดปกติ และสภาวะแวดล้อมภายในส่วนของเนฟรอน เช่น พีเอช, ออสโมลาลิตี, hypotonic osmotic solutions⁽³⁾ ปี พ.ศ. 2022 Birch และ Fairly ได้อธิบายรูปร่างเม็ดเลือดแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast (PCM) ว่ามีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติที่โกลเมอรูลัสมากกว่า 9 แบบของรูปร่าง DRBC⁽⁴⁾ ซึ่งในปี พ.ศ. 2034 Kohler H และผู้ร่วมงานได้เรียกชื่อเม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะเป็นวงแหวนและมีปุ่มยื่นออกมาว่า “อะแคนโทไซต์ (acanthocyte)” และได้พบความสัมพันธ์ที่สำคัญของการพบอะแคนโทไซต์กับการมีเลือดออกจากโกลเมอรูลัส (glomerular bleeding) ว่าหากพบอะแคนโทไซต์มากกว่าร้อยละ 5 สามารถบ่งชี้ได้ว่ามีภาวะเลือดออกจากโกลเมอรูลัส โดยมีความไวร้อยละ 52 และความจำเพาะร้อยละ 98⁽³⁾

จากการศึกษาที่ผ่านมา เกณฑ์ DRBC ที่มีความสำคัญนั้นค่อนข้างแตกต่างกันไปตั้งแต่ร้อยละ 10-90⁽⁴⁾

การตรวจพบ DRBC ในตะกอนปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์นับว่าเป็นสิ่งแรกที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วย GN แต่การแยกความแตกต่างระหว่าง isomorphic RBC กับ DRBC ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาทำได้ยาก การดูกล้อง PCM จะเห็นพื้นหลังแยกออกจากเซลล์ชัดเจน ช่วยให้ดูรายละเอียดของเซลล์ได้ดี โดยเฉพาะรายละเอียดที่มีความซับซ้อน เช่น DRBC ทำให้ตรวจพบได้ง่ายขึ้น ดังนั้นในการตรวจหา DRBC ควรใช้กล้อง PCM ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิงที่ดีที่สุด gold standard⁽⁵⁾

เครื่องตรวจตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติ UF-5000 เป็นรุ่นที่ 3 ของเครื่องอัตโนมัติที่ผ่านการพัฒนาโดย Sysmex Corporation (Kobe, Japan) อาศัยหลักการ fluorescence flow cytometry สามารถจำแนกชนิด และบอกปริมาณเซลล์ในตะกอนปัสสาวะได้ มีการรายงานเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์แยกเป็น RCB, non lysed RBC, small RBC (sRBC), large RBC, lysed RBC, RBC-P70Fsc (ให้ข้อมูลเกี่ยวกับขนาดของเม็ดเลือดแดง) และ RBC-Fsc-DW (ให้ข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของเม็ดเลือดแดง) นอกจากนี้เครื่องยังมี flag ของเม็ดเลือดแดง: isomorphic? (ในรายที่เครื่องพบเม็ดเลือดแดงรูปร่างปกติ), dysmorphic? (ในรายที่เครื่องพบเม็ดเลือดแดงรูปร่างผิดปกติหรือมีขนาดเล็ก) และ mixed? (ในรายที่เครื่องพบเม็ดเลือดแดงทั้ง 2 รูปแบบ)⁽⁶⁾

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของเครื่อง UF-5000 คือ UF-%sRBCs, UF-small RBC/large RBC, UF-small RBC, UF-large RBC, UF-NL RBC, UF-lysed RBC, UF-RBC-P70Fsc และ UF-RBC-Fsc-DW กับการตรวจพบ DRBC ด้วยกล้อง PCM

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างปัสสาวะ

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้เป็นปัสสาวะของผู้ป่วยใน ผู้ป่วยนอก และผู้ตรวจสุขภาพ โรงพยาบาลรามาริบัติที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิกในระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2564 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2565 เพื่อทำ routine urinalysis เมื่อส่งตรวจมาถึงห้องปฏิบัติการ เขย่าปัสสาวะที่อยู่ในภาชนะเบาๆ ให้เข้ากันแล้ว แบ่งใส่หลอดทดลองพลาสติกกันแหลม 1 หลอดปริมาตร 12 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UF-5000 แล้วนำไปปั่นเพื่อตรวจตะกอนปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเลือกตัวอย่างที่มี $RBC \geq 5-10 /HPF$ จำนวน 301 ราย มาตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงด้วยกล้อง PCM โดยควรตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับสิ่งส่งตรวจ⁽⁷⁾

เครื่องตรวจตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติ UF-5000

เครื่อง UF-5000 ต้องการปริมาตรปัสสาวะที่ใช้อย่างน้อย 2 มิลลิลิตร (0.6 มิลลิลิตร ใน manual mode) โดยเครื่องจะดูดปัสสาวะไปใช้ในการวิเคราะห์เพียง 0.45 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์ถูกย้อมด้วยสียูออ-เรสเซนส์แล้ว จะถูกบังคับให้ไหลเรียงเดี่ยว เข้าไปใน flow cell โดยอาศัยน้ำยา sheath fluid เซลล์ที่ถูกย้อมแล้วนี้จะเรืองแสงขึ้นเมื่อมีแสงเลเซอร์มาตกกระทบ ซึ่งสามารถวัดปริมาณแสงที่เกิดขึ้นโดยใช้ตัวรับสัญญาณ forward scattered light (FSC), side scattered light (SSL), side fluorescent light (SFL) และ depolarized side scattered light (DSS) โดยตัวรับสัญญาณแสงจะแปลงปริมาณแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้าและตรวจวัดเป็นปริมาณออกมาแสงเลเซอร์ที่ใช้ใน UF-5000 คือ blue semiconductor laser (488 นาโนเมตร) ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่มีขนาดเล็กๆ ได้ อีกทั้งยังมี DSS เพื่อช่วยแยก

ความแตกต่างระหว่างเม็ดเลือดแดงและ crystal ได้ดียิ่งขึ้น ในส่วนน้ำยาและการย้อมสียูออเรสเซนส์ได้มีการพัฒนาปรับปรุงสารเคมีให้มีความจำเพาะกับเซลล์มากขึ้น^(6, 8)

เครื่อง UF-5000 สามารถจำแนกเซลล์ชนิดต่างๆ ในตะกอนปัสสาวะได้ เช่น เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เซลล์เอพิทีเลียล มิวคัส และแบคทีเรีย และบอกจำนวนเซลล์ที่พบได้ในส่วนของการรายงาน เม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ เครื่องสามารถรายงานแยกเป็น RBC, non lysed RBC, small RBC (sRBC), large RBC, lysed RBC, RBC-P70Fsc และ RBC-Fsc-DW ซึ่งสามารถคำนวณหาร้อยละ sRBC ได้จากสูตร $\text{small RBC counts } (\mu\text{L}) \times 100 / \text{total RBC counts } (\mu\text{L})$ ⁽⁶⁾

การตรวจตะกอนปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์ phase contrast

ตรวจตะกอนปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยปฏิบัติตาม CLSI GP16-A3⁽⁹⁾ นำหลอดทดลองปัสสาวะปั่นที่ความเร็ว 400 g เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดทดลองออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยง ใส่ M-T micro tip กดลงในหลอดทดลองให้แน่นแล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้ง จะเหลือตะกอนปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร ใช้ M-T micro tip ผสมตะกอนปัสสาวะให้เข้ากันดี แล้วหยดใส่ Fast-read102⁽¹⁰⁾ ซึ่งปริมาตรที่ใช้จะเท่ากันคือ 10 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ตรวจด้วยกล้อง PCM โดยผู้ปฏิบัติการที่มีความรู้ ความชำนาญ 2 ท่าน ตรวจนับและแยกชนิด DRBC ในเม็ดเลือดแดง 100 เซลล์ เพื่อหาค่าร้อยละของ DRBC

เกณฑ์ที่ผู้วิจัยใช้ในการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างในการพบ DRBC คือ ตัวอย่างตรวจต้องมี $RBC \geq 5-10 /HPF$ (hematuria) และพบ DRBC มากกว่าร้อยละ 20 หรือพบอะแคนโทไซต์มากกว่า

ร้อยละ 5 ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่าผู้ป่วยมีเลือดออกจากโกลเมอรูลัส (glomerular bleeding)⁽⁵⁾
ลักษณะของเม็ดเลือดแดงที่จัดเป็น DRBC ที่บ่งชี้เพื่อใช้ในการจำแนกการมีเลือดออกจากส่วน glomerular bleeding คือ เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่าง

ผิดปกติบิดเบี้ยว มักมีขนาดเล็กกว่าปกติและมีส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นปุ่มยื่นออกมา (bleb) และปุ่มที่ยื่นออกมานี้อาจหลุดออกเป็นเศษเซลล์ขนาดเล็กๆ ได้ (Fig. 1)⁽¹¹⁾

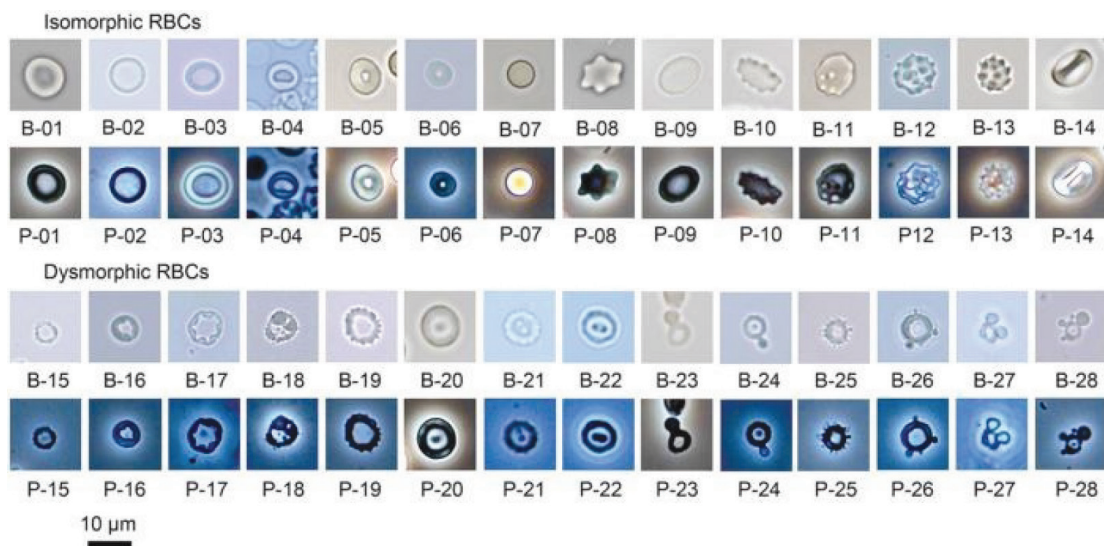


Fig. 1 Isomorphic red blood cells (RBCs) and dysmorphic RBC, original magnification x400. B; bright microscope, P; phase-contrast microscope, images 01-14 are isomorphic, images 15-28 are dysmorphic RBC.⁽¹¹⁾

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบค่า area under the curve (AUC) ของเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของเครื่อง UF-5000 คือ UF-%sRBCs, UF-small RBC/large RBC, UF-small RBC, UF-large RBC, UF-NL RBC, UF-lysed RBC, UF-RBC-P70Fsc และ UF-RBC-Fsc-DW กับการตรวจพบ DRBC โดยใช้ ROC ในการวิเคราะห์ ค่า AUC, ค่า cut off ของ Youden index โดยโปรแกรม Medcalc V.20.027 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) ค่า AUC <0.50, 0.50-0.75, 0.75-0.90, >0.90 ความหมายของการจำแนกได้อย่างถูกต้อง คือ

ไม่สามารถใช้งานได้ ใช้งานได้ค่อนข้างต่ำ ใช้งานได้ดี และใช้งานได้ดีมาก⁽¹²⁾ วิเคราะห์ flag เม็ดเลือดแดงของเครื่อง UF-5000 (RBC: mixed?, RBC: dysmorphic?) ค่าความไว ค่าความจำเพาะ positive predictive values (PPV) และ negative predictive values (NPV) โดยใช้ Microsoft Excel (© 2021 Microsoft Corporation, USA)

ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างปัสสาวะที่มีภาวะ hematuria (RBC $\geq$ 5-10 /HPF) จำนวน 301 ราย โดยใช้ ROC curve ในการ

เปรียบเทียบเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของเครื่อง UF-5000 ได้แก่ UF-%sRBCs, UF-small/large RBC, UF-small RBC, UF-large RBC, UF-NL RBC, UF-lysed RBC, UF-RBC-P70Fsc และ UF-RBC-Fsc-DW กับการตรวจพบ DRBC ด้วยกล้อง PCM ซึ่งสรุปผลดัง Table 1 พบว่าพารามิเตอร์ที่มีค่า AUC สูงที่สุด คือ UF-small RBC (/μL) มีค่า AUC = 0.667, cut off > 53.5, ค่าความไวร้อยละ 60.22, ค่าความจำเพาะร้อยละ 67.31, PPV ร้อยละ 45.2, NPV ร้อยละ 79.1 (Fig. 2A) รองลงมา คือ UF-RBC-Fsc-DW (ch) มีค่า AUC = 0.600, cut off > 44, ค่าความไวร้อยละ 83.87,

ค่าความจำเพาะร้อยละ 36.06, PPV ร้อยละ 37, NPV ร้อยละ 83.3 (Fig. 2B) ตามด้วย UF-lysed RBC (/μL) มีค่า AUC = 0.599, cut off > 3.5, ค่าความไวร้อยละ 60.22, ค่าความจำเพาะร้อยละ 63.02, PPV ร้อยละ 41.5, NPV ร้อยละ 77.7 (Fig. 2C) และ UF-NL RBC (/μL) ค่า AUC = 0.574 มีค่า cut off > 84, ค่าความไวร้อยละ 60.22, ค่าความจำเพาะร้อยละ 56.25, PPV ร้อยละ 38.1, NPV ร้อยละ 76 (Fig. 2D) ในกลุ่มตัวอย่าง 301 รายพบว่า มีการตรวจพบ DRBC ด้วยกล้อง PCM (DRBC มากกว่าร้อยละ 20 หรือพบอะแคนโทไซต์มากกว่าร้อยละ 5) จำนวน 93 ราย คิดเป็นร้อยละ 30.9

Table 1 Performance of UF-5000 RBC parameter for positive DRBC by phase contrast microscope.

Parameter	n	AUC	Cut off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	p
UF-%sRBCs (%)	301	0.562	>39.94	95.7	27.88	37.2	93.5	0.0615
UF-small RBC/large RBC	301	0.561	>0.67	95.7	27.88	37.2	93.5	0.0627
UF-small RBC (/μL)	301	0.667	>53.5	60.22	67.31	45.2	79.1	<0.0001
UF-large RBC (/μL)	301	0.539	>17.6	79.57	36.06	35.7	79.8	0.2569
UF-NL RBC (/μL)	301	0.574	>84	60.22	56.25	38.1	76	0.0331
UF-lysed RBC (/μL)	301	0.599	>3.5	60.22	62.02	41.5	77.7	0.0042
UF-RBC-P70Fsc (ch)	301	0.563	≤129	98.92	22.12	36.2	97.9	0.0535
UF-RBC-Fsc-DW (ch)	301	0.600	>44	83.87	36.06	37	83.3	0.0028

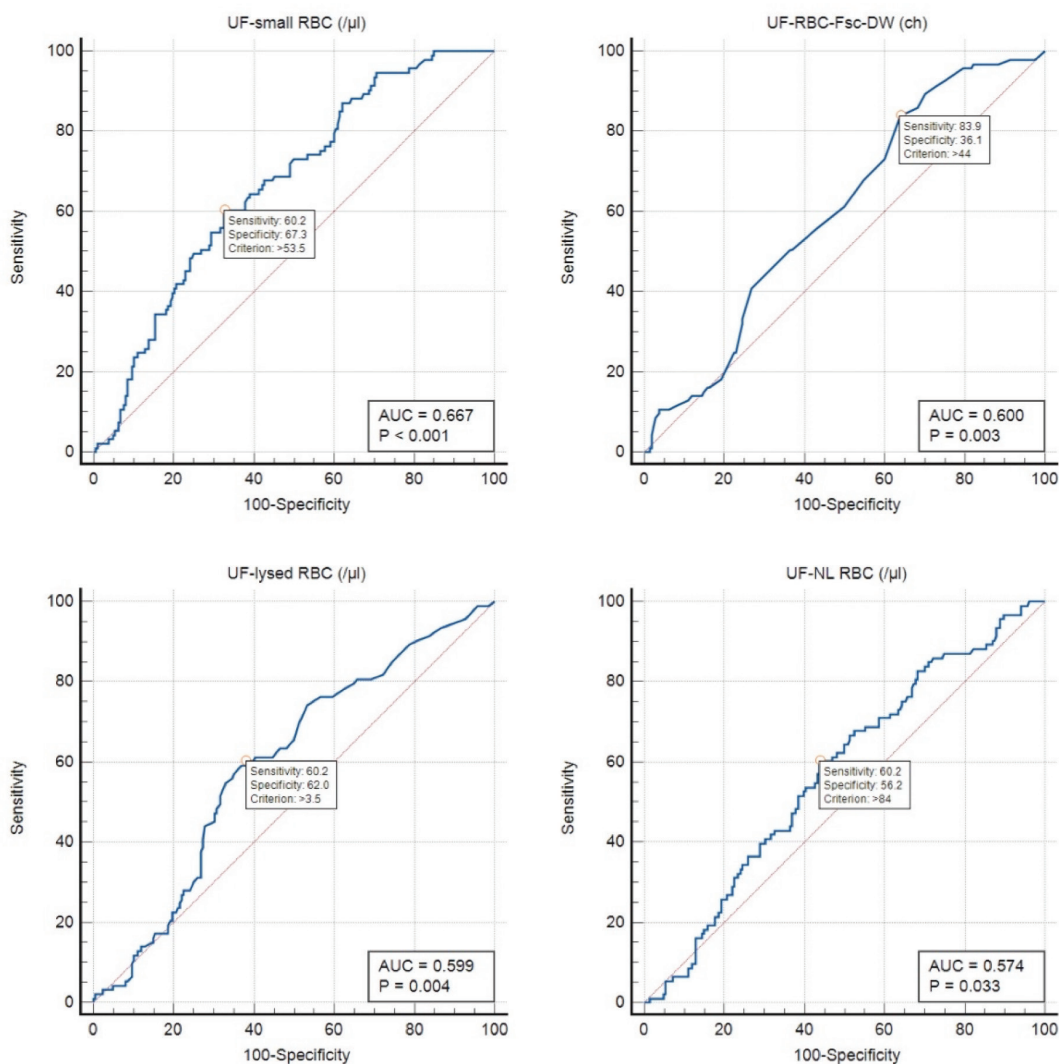


Fig. 2 ROC curve of UF-small RBC (μL), UF-RBC-Fsc-DW (ch), UF-lysed RBC (μL) and UF-NL RBC (μL) to find DRBC by PCM. The AUC value was determined to be A = 0.667, B = 0.600, C = 0.599, D = 0.574

นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบ flag ของเม็ดเลือดแดงที่ได้จากเครื่อง UF-5000 กับการตรวจพบ DRBC ด้วยกล้อง PCM พบว่า UF-flag (RBC: mixed?, RBC: dysmorphic?) มีค่าความไวร้อยละ 91.40, ค่าความจำเพาะร้อยละ 26.92, PPV ร้อยละ 35.86, NPV ร้อยละ 87.50 แต่เมื่อนำ UF-flag มารวมกับเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของ

เครื่อง UF-5000 ได้แก่ UF-small RBC (μL) ที่ cut off > 53.5, UF-RBC-Fsc-DW (ch) ที่ cut off > 44, UF-lysed RBC (μL) ที่ cut off > 3.5 และ UF-NL RBC (μL) ที่ cut off > 84 พบว่า UF-flag รวมกับ UF-small RBC (μL) มีค่าความไวร้อยละ 96.15, ค่าความจำเพาะร้อยละ 43.48, PPV ร้อยละ 49.02, NPV ร้อยละ 95.24 UF-flag

รวมกับ UF-RBC-Fsc-DW (ch) ค่าความไวร้อยละ 96.15, ค่าความจำเพาะร้อยละ 24.69, PPV ร้อยละ 38.07, NPV ร้อยละ 93.02 UF-flag รวมกับ UF-lysed RBC (/μL) ค่าความไวร้อยละ 91.38, ค่าความจำเพาะร้อยละ 39.05, PPV ร้อยละ 45.30,

NPV ร้อยละ 89.13 และ UF-flag รวมกับ UF-NL RBC (/μL) มีค่าความไวร้อยละ 96.15, ค่าความจำเพาะร้อยละ 23.08, PPV ร้อยละ 50.00, NPV ร้อยละ 88.24 (Table 2)

Table 2 Performance of UF-Flag for positive DRBC by phase contrast microscope.

Condition	n	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
UF-flag (flag = RBC : mixed?, RBC : dysmorphic?)	301	91.40	26.92	35.86	87.50
Cut off for UF-small RBC (/μL) with flag (cut off for UF-small RBC (/μL) >53.5)	144	96.15	43.48	49.02	95.24
UF-UF-NL RBC (/μL) with flag (cut off for UF-NL RBC (/μL) >84)	117	96.15	23.08	50.00	88.24
UF-lysed RBC (/μL) with flag (cut off for UF-lysed RBC (/μL) >3.5)	163	91.38	39.05	45.30	89.13
UF-RBC-Fsc-DW (ch) with flag (cut off for UF-RBC-Fsc-DW (ch) >44)	240	96.15	24.69	38.07	93.02

สรุปและวิจารณ์

จากการเปรียบเทียบเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของเครื่อง UF-5000 กับการตรวจพบ DRBC ด้วยกล้อง PCM โดยใช้ ROC curve พบว่าเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ที่ได้จากเครื่อง UF-5000 ช่วยในการคัดกรอง DRBC ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือ UF-small RBC, UF-RBC-Fsc-DW, UF-lysed RBC และ UF-NL RBC โดยที่ UF-small RBC (cut off > 53.5/μL) มีค่า AUC สูงที่สุด (0.667) เมื่อพิจารณาค่าความไว และค่าความจำเพาะของเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ร่วมกับ UF-flag พบว่า ได้ค่าความไวสูงกว่าการพิจารณาเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์เพียงอย่างเดียว และการพิจารณาเม็ดเลือดแดง

พารามิเตอร์ UF-small RBC ร่วมกับ UF-flag ได้ค่าความไวและค่าความจำเพาะสูงที่สุด (ร้อยละ 96.15 และ ร้อยละ 43.48 ตามลำดับ)

จากการศึกษาของ Mizono และคณะ พบว่า ในผู้ป่วย GN เม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของเครื่อง UF-5000 UF-%sRBCs ได้ค่า AUC มากที่สุด (AUC 0.649, cut off > ร้อยละ 56.8, ค่าความไวร้อยละ 94.1, ค่าความจำเพาะร้อยละ 38.1, PPV ร้อยละ 68.3 และ NPV ร้อยละ 82.1)⁽¹³⁾ ซึ่งผลการทดลองคล้ายกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า เม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์ของเครื่อง UF-5000 ที่ดีที่สุดในการช่วยคัดกรอง DRBC คือ UF-small RBC ซึ่งทั้งสองพารามิเตอร์เป็นพารามิเตอร์ที่ช่วยบ่งชี้ว่า

พบ RBC ที่มีขนาดเล็ก ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของ DRBC ที่มีรูปร่างบิดเบี้ยวผิดไปจากปกติที่มักมีขนาดเล็กกว่าเดิมและมีส่วนของไซโทพลาสซึมเป็นปุ่มยื่นออก และปุ่มที่ยื่นออกนี้อาจหลุดออกเป็นเศษเซลล์ขนาดเล็กๆ ได้ ยังมีการศึกษารูปแบบการกระจายตัวของ RBC ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติในผู้ป่วยที่มีภาวะ hematuria พบว่าร้อยละ 97 ของผู้ป่วย GN จะมี RBC ในปัสสาวะขนาดเล็กกว่า RBC ที่พบในกระแสเลือด และมีรูปแบบการกระจายตัวแบบไม่สม่ำเสมอและเบ้ข้าง ในขณะที่ร้อยละ 98 ของผู้ป่วยที่มีเลือดออกจากส่วนของทางเดินปัสสาวะส่วนล่างที่ไม่ใช่กลุ่มติดเชื้อ จะมี RBC ส่วนใหญ่ที่มีขนาดใหญ่กว่าที่พบในกระแสเลือด ขนาดของ RBC ช่วยบ่งชี้ถึงแหล่งที่มาของ RBC ที่พบในปัสสาวะได้⁽³⁾

เครื่องตรวจตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดภาระงานในห้องปฏิบัติการได้ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่มีปริมาณงานมาก จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าเม็ดเลือดแดงพารามิเตอร์จากเครื่อง UF-5000 มีค่าความไวที่สูง โดยยังถ้าพิจารณาพร้อมกับ UF-flag (mixed RBC และ dysmorphic RBC) ซึ่งช่วยคัดกรองเบื้องต้น ในการแยก RBC ปกติออกจาก DRBC ทำให้ผู้ปฏิบัติงานไม่ต้องดูกล้องในรายที่เครื่องไม่แสดงสัญญาณเตือน อย่างไรก็ตามเครื่องตรวจตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติ มีค่าความจำเพาะค่อนข้างต่ำ ในการวินิจฉัยโรค GN อาจต้องพิจารณาร่วมกับหลายพารามิเตอร์ เช่น โปรตีน ซึ่งการพบ DRBC กับการพบภาวะ hematuria และ proteinuria มีส่วนช่วยในผู้ป่วย GN⁽⁴⁾

จากการศึกษาครั้งนี้เครื่องตรวจตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติทำให้สามารถลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เช่น ในงานตรวจสุขภาพและในรายที่เม็ดเลือดแดงปกติ โดยไปให้ความสำคัญและตระหนักในการตรวจหา DRBC ด้วย

กล้องจุลทรรศน์ ในรายที่เครื่องแสดงสัญญาณเตือน เนื่องจากการตรวจหา DRBC ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ต้องอาศัยผู้ปฏิบัติการที่มีความรู้ ความชำนาญ กล้อง PCM เป็นอุปกรณ์ที่ดีที่สุดสำหรับการดูรายละเอียดเซลล์ต่างๆ แยกความแตกต่างของ DRBC จาก isomorphic RBC⁽¹⁾ แต่ถ้าทางห้องปฏิบัติการไม่มีกล้อง PCM ก็สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) โดยลดคอนเดนเซอร์ลงจะทำให้เห็นลักษณะที่ผิดปกติของ DRBC ได้ชัดเจนขึ้นหรือถ้าย้อมสีตะกอนปัสสาวะด้วย Sternheimer-Malbin Stain (SM-stain) จะทำให้ตรวจพบ DRBC ได้ง่ายขึ้น^(1, 3)

คณะผู้วิจัยหวังว่าในอนาคตเครื่องตรวจตะกอนปัสสาวะอัตโนมัติจะสามารถพัฒนาพารามิเตอร์ให้เป็นมาตรฐานในการช่วยคัดกรอง DRBC และมีความจำเพาะต่อ DRBC มากขึ้นได้ เพื่อเป็นประโยชน์กับห้องปฏิบัติการ และช่วยในการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี ดังต่อไปนี้ นายสุรศักดิ์ พันธุสุวรรณกุล นางสาวศศิธร กองอาษา นายเมธัส กุลชาติชัย และ นางสาวสิรินยา เหมือนศรี ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณ บริษัท เมดิทอป จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์นํ้ายาของเครื่อง UF-5000 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Becker GJ, Garigali G, Fogazzi GB. Advances in Urine Microscopy. Am J Kidney Dis 2016; 67: 954-64.

2. Ito CA, Pecoits-Filho R, Bail L, Wosiack MA, Afinovicz D, Hauser AB. Comparative analysis of two methodologies for the identification of urinary red blood cell casts. *J Bras Nefrol* 2011; 33: 402-7.
3. Aniwatangkoora Y. The identification of dysmorphic red blood cells. Bangkok: VJ printing LTD; 2020. 40 p. (in Thai)
4. Hamadah AM, Gharaibeh K, Mara KC, *et al.* Urinalysis for the diagnosis of glomerulonephritis: role of dysmorphic red blood cells. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 33: 1397-403.
5. Kim H, Kim YO, Kim Y, Suh JS, Cho EJ, Lee HK. Small red blood cell fraction on the UF-1000i Urine analyzer as a screening tool to detect dysmorphic red blood cells for diagnosing glomerulonephritis. *Ann Lab Med* 2019; 39: 271-7.
6. Nakayama A, Tsuburai H, Ebina H, Kino F. Outline and features of UF-5000, fully automated urine particle analyzer. *Sysmex Journal International* 2018; 28: 1-23.
7. Cavanaugh C, Perazella MA. Urine sediment examination in the diagnosis and management of kidney disease: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis* 2019; 73: 258-72.
8. Previtali G, Ravasio R, Seghezzi M, Buoro S, Alessio MG. Performance evaluation of the new fully automated urine particle analyser UF-5000 compared to the reference method of the Fuchs-Rosenthal chamber. *Clin Chim Acta* 2017; 472: 123-30.
9. CLSI. Urinalysis; Approved Guideline. CLSI document GP16-A3. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
10. Gunetti M, Castiglia S, Rustichelli D, *et al.* Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102[®] device, an alternative practical approach for cell counting. *J Transl Med* 2012; 10: 112.
11. Chu-Su Y, Shukuya K, Yokoyama T, Lin WC, Chiang CK, Lin CW. Enhancing the detection of dysmorphic red blood cells and renal tubular epithelial cells with a modified urinalysis protocol. *Sci Rep* 2017; 7: 40521.
12. Sarakarn P, Mulpolsri P. Optimal cut-off points for receiver operating characteristic (ROC) curve analysis in developing tools of health innovations : example using stata. *Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences* 2021; 16: 93-108. (in Thai)
13. Mizuno G, Hoshi M, Nakamoto K, *et al.* Evaluation of red blood cell parameters provided by the UF-5000 urine auto-analyzer in patients with glomerulonephritis. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59: 1547-53.