Improvement of the Detection of *Plasmodium vivax* by Using iRBC QFlag Values from the Sysmex Hematology Analyzer XN-1000 Coupled with Platelet Count

Sasis Boonmee

Clinical Hematology and Microscopy, Medical Technology Department, Maesot Hospital, Tak Province, Thailand

Abstract

Plasmodium vivax **malaria is the most prevalent in Thailand, and the prompt and accurate detection of the infection are crucial for controlling the disease pandemic. This study aimed to study the efficiency in the diagnosis of *P. vivax* malarial infection by using the "iRBC QFlag", a novel parameter developed and obtained from the Sysmex XN-1000 automated analyzer coupled with the platelet count. This is an experimental comparative research was conducted between August 1st, 2022 and October 31st, 2023. From the total of 3,818 samples, there were 1,279 cases with request for CBC and thick film tests, while 2,539 cases with request for CBC, but not thick film test. The iRBC QFlag (≥ 10 AU) and platelet count (< 140 x 10^9/L) were used to detect *P. vivax* in blood samples, and the area under the ROC curve was at 0.991 and 0.981, respectively. When using combination of iRBC QFlag (≥ 10 AU) and platelet count, the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were 97, 100, 100 and 99.8, respectively. In conclusion, the sensitivity of *P. vivax* detection increased to 97% when the iRBC QFlag value for positive cutoff was decreased and applied with the platelet counts. This finding suggest that when the value of iRBC QFlag ≥ 10 AU and PLT < 140 x 10^9/L or iRBC QFlag value of 20-300 AU and PLT ≥ 140 x 10^9/L, there may be the infection of *P. vivax* malaria, which should be confirmed by the thick blood film method.**

Keywords: iRBC QFlag, Sysmex XN-1000, *P. vivax*, Platelet

***Corresponding author E-mail address:** sasissasisboonmee@hotmail.com

Received: 18 December 2023 Revised: 26 February 2024 Accepted: 8 March 2024

#in52-2 28/06/67.indd 113 2/8/2567 BE 10:56

การพัฒนาการตรวจเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* โดยการใช้ค่า iRBC QFlag ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือด จากเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000

ศศิศ บุญมี

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ งานโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *Plasmodium vivax* เป็นโรคมาลาเรียที่มีความชุกมากที่สุดในประเทศไทย การตรวจพบการติดเชื้ออย่างรวดเร็วและแม่นยำเป็นปัจจัยสำคัญต่อการรักษาและการยับยั้งการแพร่ระบาดของโรค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* โดยใช้ค่า iRBC QFlag ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ใหม่ที่พัฒนาและรายงานด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 ควบคู่กับจำนวนเกล็ดเลือด การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลองเปรียบเทียบในช่วงระหว่างวันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2565 ถึงวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2566 โดยใช้ตัวอย่าง 3,818 ราย แบ่งเป็น 1,279 รายที่แพทย์ขอตรวจ CBC และ Thick film และ 2,539 รายที่แพทย์ขอตรวจเฉพาะ CBC โดยไม่ขอตรวจ thick film แต่มีการตรวจพบเชื้อโดยการพิจารณาจากค่า iRBC QFlag แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ค่า iRBC QFlag ≥ 10 AU และจำนวนเกล็ดเลือด < 140 x 10^9/L พบว่าค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 97, 100, 100 และ 99.8 ตามลำดับ โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC ในการใช้ค่า iRBC QFlag และค่าเกล็ดเลือด 0.991 และ 0.981 ตามลำดับ โดยสรุป ค่า iRBC QFlag มีความไวสูงขึ้นถึงร้อยละ 97 เมื่อปรับเกณฑ์ผลบวกให้มีค่าต่ำลงโดยใช้ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือด ข้อเสนอแนะจากผลการศึกษานี้ คือ ถ้าตัวอย่างมีค่า iRBC QFlag ≥ 10 AU ร่วมกับมีจำนวนเกล็ดเลือด < 140 x 10^9/L หรือมีค่า iRBC QFlag 20-300 AU ร่วมกับมีจำนวนเกล็ดเลือด ≥ 140 x 10^9/L ให้สงสัยว่าน่าจะมีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ควรตรวจยืนยันด้วยการทำฟิล์มเลือดหนา ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ค่า iRBC QFlag ≥ 10 AU และจำนวนเกล็ดเลือด < 140 x 10^9/L พบว่ามีค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC เท่ากับ 0.991 และ 0.981 ตามลำดับ และการใช้ค่า iRBC QFlag ≥ 10 AU ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือด < 140 x 10^9/L มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 97, 100, 100 และ 99.8 ตามลำดับ

คำสำคัญ: iRBC QFlag, Sysmex XN-1000, *P. vivax*, Platelet

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** sasissasisboonmee@hotmail.com

รับบทความ: 18 ธันวาคม 2566 แก้ไขบทความ: 26 กุมภาพันธ์ 2567 รับตีพิมพ์บทความ: 8 มีนาคม 2567

#in52-2 28/06/67.indd 114 2/8/2567 BE 10:56

บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อโปรโตซัวในสกุลพลาสโมเดียม (*Plasmodium* spp.) ซึ่งมีหลายชนิด ปัจจุบันเชื้อที่พบการระบาดมากที่สุดในประเทศไทยเป็นชนิด *Plasmodium vivax* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสถานการณ์การระบาดของโรคมาลาเรียในจังหวัดตากมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและพบชนิด *P. vivax* มากที่สุด[1] การระบาดของโรคมาลาเรียนับตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2565 ถึงวันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2566 (สัปดาห์ที่ 44) พบว่ามีผู้ป่วยสะสมรวม 10,230 ราย และเป็นชนิด *P. vivax* มากที่สุด คือ 10,036 ราย คิดเป็นร้อยละ 98[2] ถึงแม้ว่า *P. vivax* เป็นชนิดที่ไม่แสดงอาการรุนแรง แต่ถ้าไม่รักษาให้หายขาดเชื้อจะสามารถอยู่ในร่างกายได้นานหลายปีและอาจทำให้มีอาการไข้กลับซ้ำได้

โรคมาลาเรียจัดอยู่ในกลุ่มอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ (fever of unknown origin) และผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิด *P. vivax* มักมีเกล็ดเลือดต่ำกว่า 150 x 10^9/L ร่วมด้วย ซึ่งเป็นภาวะที่พบได้บ่อยถึงร้อยละ 80.6[3] Marcus Vinicius และคณะ รายงานว่าภาวะเกล็ดเลือดต่ำเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยที่สุด[4] และ Angesom Gebreweld และคณะ รายงานเพิ่มเติมว่าจำนวนเกล็ดเลือดต่ำเป็นตัวจำแนกที่ดีมากในการวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรีย จึงเสนอให้เพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดเข้าไปเป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ในการสันนิษฐานว่าผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียหรือไม่ ทั้งในทางคลินิกและในการตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์[5]

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียในงานประจำของงานโลหิตวิทยาคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลแม่สอด ใช้วิธีการตรวจเลือดแบบฟิล์มหนา (thick film) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และจะตรวจตามคำขอของแพทย์ ในกรณีที่แพทย์สงสัยการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วย ส่วนรายใดที่แพทย์ไม่สงสัยการติดเชื้อมาลาเรีย แพทย์จะขอตรวจเฉพาะความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete Blood Count; CBC) เพียงรายการเดียว ปัจจุบันการตรวจ CBC เป็นการตรวจด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติยี่ห้อ Sysmex XN-1000 ซึ่งมีคุณสมบัติสำคัญคือสามารถตรวจจับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ได้ดี โดยบริษัทผู้ผลิตรายงานความไว (sensitivity) ร้อยละ 84.6 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 100[6] จากการศึกษาของ Hee Jin Huh โดยใช้เครื่อง Sysmex XN-9000 ที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* เช่นกัน พบว่ามีความไวในการตรวจจับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ร้อยละ 83.6 และความจำเพาะ ร้อยละ 100[7] จากการศึกษาดังกล่าว ค่าความไวที่ได้ไม่แตกต่างกับ Sysmex XN-1000 เนื่องจากเป็นการใช้ค่า inclusion Red Blood Cell (iRBC) QFlag เท่ากับ 100-300 AU (Arbitrary units) เป็นเกณฑ์ให้ผลเป็นบวกเพียงอย่างเดียว โดยไม่ได้ใช้ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือด ขณะเดียวกันในปัจจุบันยังไม่มีการนำเอาจำนวนเกล็ดเลือดมาใช้ร่วมกับการวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ร่วมกับค่า iRBC QFlag ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจถ้าทำการศึกษาการใช้ค่า iRBC QFlag โดยการปรับเกณฑ์ผลบวกจากเดิมที่มีค่าเท่ากับ 100-300 AU เป็นเกณฑ์ผลบวกใหม่เท่ากับ 10-300 AU ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือดในการจำแนกการมีหรือไม่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ซึ่งน่าจะทำให้ค่าความไวของการตรวจพบเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ทั้งนี้เพื่อให้เป็นไปตามเป้าหมายของงานควบคุมและกำจัดโรคไข้มาลาเรียในพื้นที่แพร่เชื้อมาลาเรียสูง (High transmission areas) นั่นคือการลดจำนวนป่วย จำนวนตายและความรุนแรงของการแพร่เชื้อโดยการวินิจฉัยที่ถูกต้องและรวดเร็ว[8]

#in52-2 28/06/67.indd 115 2/8/2567 BE 10:56

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

เป็นการศึกษาเชิงทดลองเปรียบเทียบ (experimental comparative research) ในช่วงระหว่างวันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2565 ถึง วันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2566 จากกลุ่มตัวอย่างเลือด Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ทั้งหมด 6,448 ราย จำแนกเป็นตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยงานประจำแผนกผู้ป่วยนอกและห้องฉุกเฉิน จำนวน 3,818 ราย และตัวอย่างเลือดกลุ่มคนปกติที่ตรวจสุขภาพประจำปี จำนวน 2,630 ราย การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลแม่สอด เลขที่ 46/2566

ขนาดตัวอย่าง[9, 10]

$$\text{คำนวณจากสูตร } n = \frac{n_0 \times 100}{\%\ \text{prevalence}} \quad \text{โดย} \quad n_0 = \frac{Z^2\ \alpha/2p(1-p)}{e^2}$$

โดยแทนค่าความไว เท่ากับ 85 และ p เท่ากับ 0.85 และกำหนดให้ α เท่ากับ 0.05, Z $\alpha/2$ เท่ากับ 1.96, e เท่ากับ 0.10 และ % prevalence เท่ากับ 1.6

$$n_0 = \frac{Z^2\ \alpha/2p(1-p)}{e^2} = \frac{1.96^2 \times 0.85\ (1-0.85)}{0.1^2} = 50.0$$

$$\text{ขนาดตัวอย่างทั้งหมด } n = \frac{50 \times 100}{1.6} = 3{,}125$$

วิธีการศึกษา

กำหนดค่า Q-Flag เฉพาะ inclusion Red Blood Cell (iRBC) ในเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 (Sysmex Corp., Kobe, Japan) โดยเปลี่ยนจากเกณฑ์ผลบวกเดิม (100-300 AU) ให้เป็น 10-300 AU แล้วนำตัวอย่างเลือด EDTA ของผู้ป่วยจากงานประจำแผนกผู้ป่วยนอกและห้องฉุกเฉินและตัวอย่างเลือด EDTA กลุ่มคนปกติที่ตรวจสุขภาพประจำปีตรวจด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 เมื่อตัวอย่างรายใดมีค่า iRBC ในช่วง 10-300 AU ให้ส่งข้อมูลเข้าไปในระบบ Laboratory Information System (LIS) โดยให้แสดงผลเป็น “review” ในหน้าต่างรายงานผล

ตรวจสอบผลการตรวจ CBC ในช่อง iRBC ในหน้าต่างรายงานผลของระบบ LIS ถ้าปรากฏตัวอักษร “review” แสดงว่าเครื่องตรวจจับเชื้อมาลาเรียได้ จากนั้นให้นำตัวอย่างรายเดียวกันนี้ไปตรวจ thick film โดยการย้อมด้วยสี Wright’s Giemsa ต่อทันที ถ้าหากพบเชื้อมาลาเรียให้ป้อนคำขอตรวจ thick film เพิ่มในรายการตรวจ เพื่อให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการบันทึกผลการตรวจพบเชื้อดังกล่าวเข้าระบบ LIS สไลด์ที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* จะถูกตรวจสอบความถูกต้องโดยนักเทคนิคการแพทย์ที่ผ่านการประเมินสมรรถนะการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ในระดับประเทศ (National Competency Assessment) ได้ level A หรือ B

และ/หรือ ผ่านการประเมินการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์จากองค์การอนามัยโลก (External Competency Assessment) ได้ level 1 หรือ 2 และมีใบรับรองผลการสอบที่ยังไม่หมดอายุ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติเชิงพรรณนา แสดงข้อมูลจำนวนการส่งตรวจ CBC และ thick film เป็นจำนวนและร้อยละ แสดงข้อมูลทางโลหิตวิทยาเป็นค่าเฉลี่ย แสดงจำนวนผู้ป่วยโรคมาลาเรียชนิด *P. vivax* จำแนกตามค่า iRBC QFlag และจำนวนเกล็ดเลือดเป็นจำนวนและร้อยละ ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และประเมินความถูกต้องของค่า Cutoff ด้วย ROC curve[10-12]

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบพบว่าตัวอย่างเลือด EDTA ของผู้ป่วยแผนกผู้ป่วยนอกและห้องฉุกเฉินในช่วงระยะเวลา 457 วัน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2565 ถึงวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2566 มีจำนวน 3,818 ราย แบ่งเป็นสองกรณี คือ Requested และ Not requested โดย Requested เป็นกรณีที่แพทย์สงสัยว่ามีการติดเชื้อมาลาเรียจึงขอตรวจ CBC และ thick film ซึ่งมีจำนวน 1,279 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.0 โดยเฉลี่ย 3 รายต่อวัน กรณีนี้ตรวจพบเชื้อมาลาเรียเป็นชนิด *P. vivax* จำนวน 123 ราย คิดเป็นร้อยละ 9.6 และเป็นชนิด *P. falciparum* จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3 ส่วน Not request ซึ่งเป็นกรณีที่แพทย์ไม่สงสัยว่ามีการติดเชื้อมาลาเรียและขอตรวจ CBC รายการเดียว กรณีนี้เมื่อผลตรวจ CBC ได้ค่า iRBC QFlag แสดงผลเป็น “review” ซึ่งแสดงว่าเครื่องตรวจจับมาลาเรียได้ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยาคลินิกต้องนำตัวอย่างรายเดียวกันนี้ไปตรวจ thick film ต่อและหากตรวจพบเชื้อมาลาเรียให้แจ้งผลการตรวจและป้อนข้อมูลหรือคำขอตรวจ (request) รายการ thick film เข้าระบบ LIS เพื่อให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการได้บันทึกผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่แพทย์ไม่สงสัยว่ามีการติดเชื้อมาลาเรีย (Not requested) จำนวน 2,539 ราย คิดเป็นร้อยละ 67.0 โดยเฉลี่ย 6 รายต่อวัน กรณีนี้มีตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* 38 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.5 (Table 1)

สำหรับค่าเฉลี่ยทางโลหิตวิทยาของคนปกติและของคนที่เป็นโรคมาลาเรียพบว่าค่าพารามิเตอร์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงค่าปกติ[13] ยกเว้นค่าเกล็ดเลือดที่มีค่าน้อยกว่า 140 x 10^9/L ในกลุ่มที่คนที่เป็นโรคมาลาเรียทั้งชนิด *P. vivax* และ *P. falciparum* สำหรับค่า iRBC QFlag ของคนปกติจะมีค่าเท่ากับ 0 AU ขณะที่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* จะมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 223 ± 104.2 AU ส่วนผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จะมีค่าเฉลี่ยน้อยกว่า 10 AU (Table 2)

จากตัวอย่างที่เป็นเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ทั้งหมด 161 ราย จะแสดงค่า “review” ในหน้าต่างรายงานผลทุกรายคิดเป็นร้อยละ 100 จำแนกเป็นตัวอย่างที่มีจำนวนเกล็ดเลือดน้อยกว่า 140 x 10^9/L มีจำนวน 135 ราย คิดเป็นร้อยละ 84.0 โดยมีค่า iRBC QFlag อยู่ระหว่าง 10-90 AU จำนวน 29 ราย คิดเป็นร้อยละ 21.5 และมีค่า iRBC QFlag อยู่ระหว่าง 100-300 AU จำนวน 106 ราย คิดเป็นร้อยละ 78.5 และตัวอย่างที่มีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า 140 x 10^9/L มีจำนวน 26 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.0 โดยมีค่า iRBC QFlag อยู่ระหว่าง 10-90 AU จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 19.3 และมีค่า iRBC QFlag อยู่ระหว่าง 100-300 AU จำนวน 21 ราย คิดเป็นร้อยละ 80.7 (Table 3) เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของค่า iRBC QFlag

ระหว่างตัวอย่างคนปกติกับตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* พบว่า ตัวอย่างคนปกติทั้งหมด 2,630 ราย มีค่า iRBC QFlag เท่ากับ 0 AU ขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* จะมีค่า iRBC QFlag ตั้งแต่ 10-300 AU เมื่อปรับเกณฑ์ผลบวกใหม่ของค่า iRBC QFlag จากเดิมมากกว่าหรือเท่ากับ 100 ให้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 10 AU จะให้ค่าความไวสูงขึ้นโดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC เท่ากับ 0.991 (Fig. 1) เช่นเดียวกันกับค่าเกล็ดเลือดที่พบว่าในตัวอย่างของคนปกติทั้งหมดจะมีค่าอยู่ในช่วงปกติแต่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ส่วนใหญ่จะมีค่าต่ำกว่าช่วงปกติ ดังนั้นเมื่อใช้จำนวนเกล็ดเลือดเป็นตัวจำแนกการมีหรือไม่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* จะทำให้ค่าความถูกต้องสูงโดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC เท่ากับ 0.981 (Fig. 2) การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ปรับเกณฑ์ผลบวกจากเดิมที่มีค่า iRBC QFlag 100-300 AU อย่างเดียวให้เป็นเกณฑ์ผลบวกใหม่ โดยใช้ค่า iRBC QFlag ≥ 10 AU ร่วมกับการมีจำนวนเกล็ดเลือดน้อยกว่า 140 x 10^9/L พบว่าตัวอย่างคนปกติทั้งหมด 2,630 ราย ที่ไม่มีเชื้อมาลาเรียมีค่า iRBC QFlag เท่ากับ 0 คิดเป็นผลลบจริง (true negative) จำนวน 2,630 ราย ผลบวกปลอม (False positive) จำนวน 0 ราย ส่วนตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ร่วมกับมีค่า iRBC QFlag 10-300 AU และมีจำนวนเกล็ดเลือดน้อยกว่า 140 x 10^9/L มีจำนวน 135 ราย เมื่อนำไปรวมกับตัวอย่างที่มีค่า iRBC QFlag 100-300 AU แต่มีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า 140 x 10^9/L จำนวน 21 ราย คิดเป็นผลบวกจริง (true positive) ทั้งหมด 156 ราย และตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ร่วมกับมีค่า iRBC QFlag 10-90 AU และมีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า 140 x 10^9/L คิดเป็นผลลบปลอม (false negative) จำนวน 5 ราย ดังนั้นเมื่อนำไปคำนวณค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) จึงมีค่าเป็นร้อยละ 97, 100, 100 และ 99.8 ตามลำดับ (Table 4)

Table 1 Number of CBC and thick film requests, between August 1, 2022 and October 31, 2023 (n = 3,818).

Items		Number (%)	Average/ day	Light Microscopy (%)		
				Negative	*P. vivax*	*P. falciparum*
Requested	CBC & Thick film	1,279 (33.0)	3	1,152 (90.1)	123 (9.6)	4 (0.3)
Not requested	Thick film	2,539 (67.0)	6	2,501 (98.5)	38 (1.5)	0 (0.0)

Requested : CBC and thick film test ordered by medicine

Not requested: Performed thick film by laboratory personnel after CBC result showed “review”

Table 2 Hematological data of normal and malaria-infected samples.

Parameter	$\bar{X}$ ± SD			Normal range
	Normal (n = 2,630)	*P. vivax* (n = 161)	*P. falciparum* (n = 4)	
WBC (x 10^9/L)	7.0 ± 1.78	6.4 ± 2.4	5.7 ± 1.9	5.0 – 10.0
Neutrophil (%)	56.2 ± 8.3	69.2 ± 20.2	71.0 ± 7.5	44.0 – 75.0
Lymphocyte (%)	34.3 ± 7.6	22.1 ± 12.3	20.8 ± 10.5	20.0 – 45.0
Monocyte (%)	5.6 ± 1.4	7.0 ± 3.4	7.5 ± 3.8	2.0 – 10.0
Eosinophil (%)	3.3 ± 3.0	1.4 ± 1.6	1.4 ± 1.6	0.0 – 6.0
Basophil (%)	0.6 ± 0.3	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 – 4.0
RBC (x 10^{12}/L)	5.04 ± 0.6	4.7 ± 0.9	4.5 ± 0.4	4.20 – 5.50
HGB (g/dL)	13.7 ± 1.7	12.8 ± 2.3	12.1 ± 1.9	Female 12.0 – 16.0, Male 13.0 – 19.0
Hct (%)	41.2 ± 4.4	37.4 ± 6.8	34.9 ± 5.3	Female 36.0 – 48.0, Male 39.0 – 57.0
MCV (fL)	82.5 ± 8.9	79.5 ± 8.4	77.4 ± 5.1	80.0 – 94.0
MCH (pg)	27.4 ± 3.6	27.3 ± 3.4	27.1 ± 2.3	27.0 – 31.0
MCHC (g/dL)	33.2 ± 1.3	34.4 ± 1.3	34.7 ± 1.1	32.0 – 36.0
RDW	14.1 ± 2.1	14.3 ± 2.5	13.7 ± 0.8	11.0 – 15.0
PLT (x 10^9/L)	**279 ± 69.8**	**93 ± 53.8**	**68 ± 81.3**	**140 – 450**
iRBC QFlag (AU)	**0**	**223 ± 104.2**	**< 10.0**	**< 10.0**

Table 3 Number of *P. vivax* malaria patients classified by iRBC QFlag value and platelets value (n = 161).

iRBC QFlag value	*P. vivax* (%)	
	Platelets < 140 x 10^9/L (n = 135)	Platelets ≥ 140 x 10^9/L (n = 26)
10	6 (4.4)	0 (0.0)
20	2 (1.5)	1 (3.8)
30	1 (0.7)	0 (0.0)
40	5 (3.7)	1 (3.8)
50	2 (1.5)	1 (3.8)
60	2 (1.5)	0 (0.0)
70	7 (5.2)	1 (3.8)
80	2 (1.5)	0 (0.0)
90	2 (1.5)	1 (3.8)
≥ 100	106 (78.5)	21 (80.7)

Table 4 Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value from positive cut-off; iRBC QFlag ≥ 10 AU and Platelets < 140 x 10^9/L.

XN-1000	Light Microscopy (Thick film)		
	Positive	Negative	Total
Positive	156 (True positive)	0 (False positive)	156
Negative	5 (False negative)	2,630 (True negative)	2,635
Total	161	2,630	2,791
Sensitivity		97%	
Specificity		100%	
Positive predictive value		100%	
Negative predictive value		99.8%	

#in52-2 28/06/67.indd 120 2/8/2567 BE 10:56

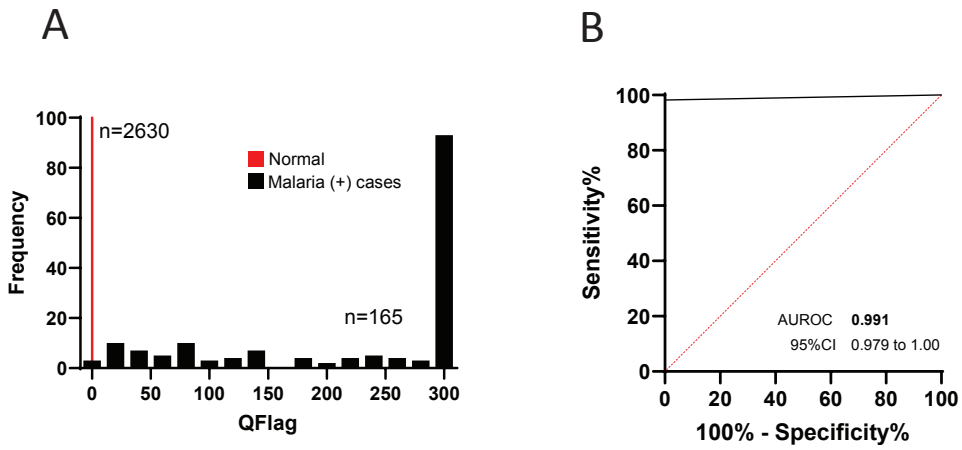

Fig. 1 iRBC QFlag analysis among malaria-infected cases and normal controls. (A) Frequency distribution iRBC QFlag values showing a right skew for positive cases. Instrument default iRBC QFlag needs to be adjusted to improve sensitivity. (B) Area under the Receiver Operating Curve showing significant diagnostic accuracy using the iRBC QFlag for malaria detection.

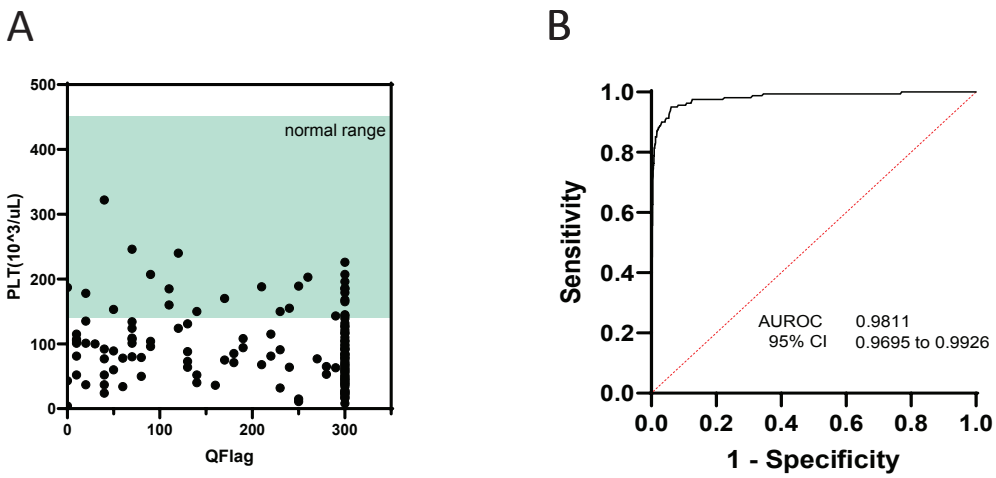

Fig. 2 Platelet (PLT) distribution among malaria-infected cases and comparison with healthy individuals. (A) Distribution of PLT levels among Malaria cases in comparison with iRBC QFlag (B) Area under the Receiver Operating Curve showing significant diagnostic dissimilar characteristics using the PLT as a measure to differentiate normal controls and malaria infected cases.

วิจารณ์และสรุป

การพัฒนาการตรวจเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* โดยการใช้ค่า iRBC QFlag ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือดจากเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 โดยการกำหนดค่า Q-Flag ใหม่เฉพาะค่า iRBC ในเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 และปรับเกณฑ์ผลบวกจากเกณฑ์ผลบวกเดิมที่ใช้ค่า iRBC QFlag 100-300 AU อย่างเดียวให้เป็นเกณฑ์ผลบวกใหม่คือเมื่อมีค่า iRBC QFlag 10-300 AU และมีจำนวนเกล็ดเลือดน้อยกว่า 140 x 10^9/L จะทำให้ค่าความไวในการตรวจจับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ของค่า iRBC QFlag เพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 97 ซึ่งสูงกว่าผลการศึกษาของ Shanaz Khodaiji และคณะ ปี ค.ศ. 2023 ที่มีค่าความไวเพียงร้อยละ 88.7[14] ขณะที่ค่าทำนายผลบวกยังคงมีค่าสูงถึงร้อยละ 100 ดังนั้นหากนำเกณฑ์ใหม่นี้ไปใช้ในงานประจำจะทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* เพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ควรคำนึงถึงภาระงานที่อาจเพิ่มขึ้นกรณีมีบุคลากรไม่เพียงพอ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าต้องตรวจ thick film จากตัวอย่างที่ไม่ได้มีการร้องขอให้ตรวจโดยแพทย์แต่เป็นการคัดเลือกโดยการดูผล CBC ในช่อง iRBC ที่แสดง “review” เป็นจำนวนทั้งสิ้น 2,539 ราย คิดเป็นร้อยละ 67 หรือเฉลี่ย 6 รายต่อวัน เพิ่มขึ้นจากปกติ 3 รายต่อวัน อย่างไรก็ตามแม้ภาระงานที่เพิ่มขึ้นแต่สามารถช่วยให้แพทย์วินิจฉัยโรคมาลาเรียชนิด *P. vivax* ได้เพิ่มมากขึ้นเป็นจำนวน 38 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.5 (Table 1) ถือได้ว่าคุ้มค่ามากกว่าเพราะผู้ป่วยจะได้รับการรักษาที่รวดเร็วไม่ล่าช้า (delay treatment) อีกทั้งเป็นการลดการแพร่เชื้อด้วย ถ้าหากพิจารณาเปรียบเทียบกับการใช้เกณฑ์ผลบวกเดิมคือใช้ค่า iRBC QFlag มากกว่าหรือเท่ากับ 100-300 AU เพียงอย่างเดียว พบว่ามีตัวอย่างเลือด 127 รายที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* คิดเป็นค่าความไวเพียงร้อยละ 79 ซึ่งต่ำกว่าของ Sysmex ที่ทำไว้เท่ากับร้อยละ 85 นั่นหมายความว่าผู้ป่วยจำนวน 34 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 21 จะไม่ได้รับการรักษา แต่เมื่อได้ปรับเกณฑ์ผลบวกใหม่ซึ่งต้องคัดเลือกเอาตัวอย่างเลือดที่แพทย์ไม่ได้สงสัยว่ามีการติดเชื้อมาลาเรียมาตรวจแบบฟิล์มหนาเพิ่มเติมจึงทำให้มีโอกาสได้ตรวจเจอตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* สูงถึง 29 ราย ดังนั้นเมื่อรวมจำนวนตัวอย่างเลือดทั้งหมดที่พบมาลาเรียชนิด *P. vivax* จึงมีเท่ากับ 156 ราย คิดเป็นค่าความไวเท่ากับร้อยละ 97 ดังแสดงใน Table 3

เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 แม้ว่ามีความไวในการตรวจจับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* สูงมากแต่กลับมีความไวในการตรวจจับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ต่ำมากหรือไม่สามารถตรวจจับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ได้ ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ที่พบในกระแสเลือดส่วนใหญ่มีแต่ระยะ ring form จึงไม่สามารถถูกย้อมด้วยสีเรืองแสง (fluorescence) ที่ใช้ในการตรวจได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงพบตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวน 3 รายที่มีค่า iRBC QFlag เท่ากับ 0 AU และมี 1 รายที่มีค่า iRBC QFlag เท่ากับ 20 AU ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่าค่าความไวการวินิจฉัยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ของเครื่อง Sysmex XN-series มีค่าเพียงร้อยละ 9.5 เช่นเดียวกับผลการศึกษาที่ Cecile Dumas และคณะ รายงานว่าค่าความไวในการวินิจฉัยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ของเครื่อง Sysmex XN-10 มีค่าเพียงร้อยละ 7.8[6, 14, 15] ค่า iRBC QFlag ของเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 นอกจากไม่สามารถตรวจจับเชื้อมาลาเรียชนิด

#in52-2 28/06/67.indd 122 2/8/2567 BE 10:56

P. falciparum ได้ อาจทำให้เกิดผลลบปลอมจากการที่มีค่า iRBC QFlag 10-90 AU และมีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 140 x 10^9/L ได้ และค่า iRBC QFlag ของเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 สามารถให้ผลบวกปลอมกับตัวอย่างผู้ป่วยที่เป็นโรค G-6PD deficiency with hemolysis crisis ได้ เพราะจากการศึกษาครั้งนี้พบตัวอย่าง 2 ราย ที่มีค่า iRBC QFlag 300 AU แต่เมื่อนำไปตรวจ thick film แล้วกลับไม่พบเชื้อมาลาเรีย เมื่อพิจารณาตัวอย่างเลือดทั้ง 2 ราย ดังกล่าวพบว่ามีภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) สีน้ำเหลืองเป็นสีน้ำตาลดำ (Coca cola หรือ coke plasma) ตรวจฟิล์มเลือดชนิดบาง (thin blood film) พบ bite cells หรือ hemoglobin-leaked cells จำนวนมาก เมื่อนำไปตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6PD ด้วยวิธี fluorescence spot test ไม่พบการเรืองแสงทั้ง 2 ราย จึงสรุปได้ว่าผู้ป่วยเป็น G-6PD deficiency

โดยสรุป เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000 มีความไวเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปรับเกณฑ์ผลบวกของค่า iRBC QFlag ให้มีค่าต่ำลง และใช้ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือดเป็นตัวจำแนกการมีหรือไม่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ผู้วิจัยแนะนำให้ใช้เกณฑ์ผลบวกดังนี้ ตัวอย่างรายใดมีค่า iRBC QFlag มากกว่าหรือเท่ากับ 10 AU ร่วมกับมีจำนวนเกล็ดเลือดน้อยกว่า 140 x 10^9/L ให้สงสัยว่าน่าจะมีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ควรตรวจ thick film เพื่อยืนยัน หรือถ้าตัวอย่างรายใดมีค่า iRBC QFlag 20-300 AU ร่วมกับมีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 140 x 10^9/L ให้สงสัยว่าตัวอย่างรายนี้น่าจะมีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ควรตรวจ thick film เพื่อยืนยัน ส่วนตัวอย่างที่มีค่า iRBC QFlag เท่ากับ 10 AU และมีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 140 x 10^9/L ไม่ต้องทำ thick film เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ตัวอย่างที่มีค่า iRBC QFlag เท่ากับ 10 AU และมีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า 140 x 10^9/L เมื่อนำไปทำ thick film แล้วจะไม่พบเชื้อมาลาเรียซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นคนไข้ที่มีลักษณะของฟิล์มเลือดเป็น thalassemia ที่อาจตรวจพบ Cabot ring, Howell jolly body และ basophillic stripping

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ รวมถึงเพื่อนร่วมงานโลหิตวิทยาคลินิกที่ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ทิพวรรณ สังขพงษ์ อาจารย์กลุ่มงานโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่กรุณาช่วยตรวจสอบและแก้ไขให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Jetsadawut B. Malaria situation and patients' characteristics in Thasongyang District, Tak Province, Fiscal Years 2018-2022. J of Pub Health Tak Province 2023; 3. (in Thai)
2. Center of Vector Borne Disease Control 2,3 (Mae Sot), Tak Province. Malaria patient accumulative in Tak Province. 2023. Available from: https://www.facebook.com/photo/?fbid=661980779372328&set=a.422537509983324
3. Shaikh OH, Ahmad SM, Abbasi A, Malik SA, Sahito AA, Munir SM. Thrombocytopenia in malaria. J Coll Physicians Surg Pak 2009; 19: 708-10.

#in52-2 28/06/67.indd 123 2/8/2567 BE 10:56

4. Marcus VGL, Maria PGM, Helena CCC, Joao BS. Thrombocytopenia in malaria: who cares? Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2011; 106: 52-63.
5. Angesom G, Yonas E, Daniel GF, Gebru H, Temesgen F. Thrombocytopenia as a diagnostic marker for malaria in patients with acute febrile illness. J Trop Med 2021; 2021: 5585272. doi: 10.1155/2021/5585272.
6. XN-Series "pRBC?" flagging performance, Automated Hematology Analyzer XN-Series. Sysmex Corportion.
7. Hee JH, Jae-Woo C, Seong YP, Seok-Lae C. Vivax malaria detection using a parasitic red blood cell flag generated by the Sysmex XN-9000 hematology analyzer. Int J Lab Hematol 2021; 43: 1403-7.
8. Division of vector borne diseases. Guidelines for malaria elimination work for medical and public health personnel in Thailand. Printed no. 1. Bangkok: Aksorn graphic and design publishing; 2019. (in Thai)
9. Rapepun C. Sample size. Thai Bull Pharm Sci 2007; 4: 1-15. (in Thai)
10. Haldun A. User's guide to sample size estimation in diagnostic accuracy studies. Turk J Emerg Med 2022; 22: 177-85
11. Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. Clinical epidemiology: A basic science for clinical medicine. 2ed. New York: Little Brown and co; 1991.
12. Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver-Operating Characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. Circulation 2007; 115: 654-7.
13. Clinical hematology and microscopy. Maesot Hospital. Standard Operating Procedure: CBC examination 2023.
14. Shanaz K, Kunal S, Monisha S, Dia M. Rapid detection of *Plasmodium vivax* by the hematology analyzer for population screening. Diagnostics 2023; 13, 3397; https://doi.org/10.3390/diagnostics13223397
15. Cecile D, Pauline TC, Fanelie M, *et al*. Flagging performance of Sysmex XN-10 hematology analyser for malaria detection. J Clin Pathol 2020; 73: 676-7.

#in52-2 28/06/67.indd 124 2/8/2567 BE 10:56