การประเมินวิธี Partec Single-Platform Volumetric CyFlow® Counter System ในการตรวจหาค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 จากห้องปฏิบัติการหลายแห่งในประเทศไทย

Multisite Evaluation of Partec Single-Platform Volumetric CyFlow® Counter System for Determining Percentage and Absolute Numbers of CD4 T Lymphocytes in Thailand

โดย

นายสุรพล เกาะเรียนอุดม
นายศักดิ์ชัย เดชตรัยรัตน์

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง
ตำแหน่งนักวิชาการสาธารณสุขเชี่ยวชาญ (ด้านส่งเสริมพัฒนา)
ตำแหน่งเลขที่ 3582 กองโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลตำรวจ โรงพยาบาลเลย โรงพยาบาลสระแก้ว โรงพยาบาลกาฬสินธุ์ โรงพยาบาลชัยภูมิ โรงพยาบาลพระนครศรีอยุธยา และโรงพยาบาลเกาะสมุย ที่ช่วยดำเนินการตรวจวัดค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยโฟลไซโทเมทรี แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และขอขอบคุณบริษัทเอ็มพีเมดกรุ๊ป จำกัด ที่ให้การสนับสนุนชุดน้ำยาตรวจ และเครื่อง CyFlow® Counter (Partec) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ชื่อเรื่อง การประเมินวิธีPartec Single-Platform Volumetric CyFlow® Counter System ในการตรวจหาค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 จากห้องปฏิบัติการหลายแห่งในประเทศไทย

Multisite Evaluation of Partec Single-Platform Volumetric CyFlow® Counter System for Determining Percentage and Absolute Numbers of CD4 T Lymphocytes in Thailand

ผู้วิจัย นายสุรพล เกาะเรียนอุดม สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
ผศ. ศักดิ์ชัย เดชตรัยรัตน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

ทำการประเมินวิธี Partec single-platform volumetric CyFlow® counter เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานโฟลไซ โตเมตรี เพื่อตรวจหาค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์เซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 จากในตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ 550 ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล 7 แห่ง การศึกษาเปรียบเทียบวิธี CyFlow® counter กับวิธี BD FACSCount ในห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง และวิธีโฟลไซโทเมทรีแบบ dual-platform ในห้องปฏิบัติการ 5 แห่ง พบว่ามีความสัมพันธ์กันในระดับสูงมาก โดยความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของเซลล์ CD4 มีค่า r =0.98 ถึง 0.99 และ ความสัมพันธ์ของค่าสัมบูรณ์ของ เซลล์ CD4 มีค่า r =0.96 ถึง 0.99 การวิเคราะห์ด้วย Bland-Altman plot ความ แตกต่างเฉลี่ยของวิธี CyFlow® counter และวิธี BD FACSCount ของค่าร้อยละของเซลล์ CD4 เท่ากับ -0.4% (95%CI -2.6 to 1.8) และ0.3% (95%CI -3.3 to 3.9) และของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 เท่ากับ -81.5 cells/μl (95%CI -199.4 to 36.4) และ -44.3 cells/μl (95%CI -145.5 to 57.0) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธี CyFlow® counter กับวิธีโฟลไซโทเมทรีแบบ dual-platform ที่ใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์รุ่น Epics XL (3 แห่ง) และรุ่น FC 500 (2 แห่ง) ความแตกต่างเฉลี่ยของค่าร้อยละของเซลล์ CD4 เท่ากับ-0.7% (95%CI -2.9 to 1.6), -0.1% (95%CI -3.6 to 3.4), 0.2% (95%CI -4.1 to 4.5), -0.4% (95%CI -3.1 to 2.4) และ0.6% (95%CI -2.4 to 1.3) และของค่า สัมบูรณ์ของเซลล์CD4 เท่ากับ -68.6 cells/μl (95%CI -154.0 to 16.9), -37.6 cells/μl (95%CI -166.4 to 91.3), -59.7 cells/μl (95%CI -224.8 to 105.4), -1.9 cells/μl (95%CI -140.1 to 143.9) และ -32.2 cells/μl (95%CI - 91.4 to 27.0) ตามลำดับ ผลการประเมินจากการศึกษานี้แสดงถึงความเหมาะสมของวิธี CyFlow® counter สำหรับใช้ตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ในตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อเอ็ชไอวี/ผู้ป่วยเอดส์เทียบได้กับวิธีมาตรฐานโฟลไซโตเมตรีที่นิยมใช้ในปจจุบันในประเทศไทย

Abstract

The Partec single-platform volumetric CyFlow® counter was evaluated and compared with standard flow cytometry for measuring the percentage and absolute CD4 T lymphocytes in 550 blood samples of HIV/AIDS patients in 7 hospital laboratory sites. Comparison of CyFlow® counter with BD FACSCount (2 sites) and dual-platform flow cytometry (5 sites) had very good correlation of both the percentage CD4 (r=0.98 to 0.99) and the absolute CD4 numbers (r=0.96 to 0.99). Using

the Bland-Altman plot, the mean difference of the CyFlow® counter and BD FACSCount (2 sites) were -0.4% (95%CI -2.6 to 1.8) and 0.3% (95%CI -3.3 to 3.9) for percentage CD4 and -81.5 cells/μl (95%CI-199.4 to 36.4) and -44.3 cells/μl (95%CI -145.5 to 57.0) for absolute CD4 numbers respectively. The mean difference of the CyFlow® counter and dual-platform flow cytometry using Epics XL flow cytometer (3 sites) and FC 500 flow cytometer (2 sites) were -0.7% (95%CI -2.9 to 1.6), -0.1% (95% CI -3.6 to 3.4), 0.2% (95%CI -4.1 to 4.5), -0.4% (95%CI -3.1 to 2.4) and 0.6% (95%CI -2.4 to 1.3) for percentage CD4 and -68.6 cells/μl (95%CI -154.0 to 16.9),-37.6 cells/μl (95%CI -166.4 to 91.3), -59.7 cells/μl (95%CI -224.8 to 105.4), -1.9 cells/μl (95%CI -140.1 to 143.9) and -32.2 cells/μl (95%CI -91.4 to 27.0) for absolute CD4 numbers respectively. The results obtained from this study supported the suitability of CyFlow® counter for measuring percentage and absolute CD4 T lymphocytes. in patients with HIV/AIDS as the standard single- and dual-platform flow cytometry currently used in Thailand.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1.....บทนำ	**1**
ความเปนมาและความสำคัญของการศึกษา	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2....เอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
โฟลไซโทมิเตอร์ (Flow Cytometer)	3
วิธีการวัดเซลล์ของโฟลไซโทมิเตอร์	3
ชนิดของเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์	5
โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล	6
บทที่ 3....วัสดุและวิธีการศึกษา	7
ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ	7
การเก็บตัวอย่างเลือดและวิธีส่ง	7
ขั้นตอนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ	7
การควบคุมคุณภาพ	8
การวิเคราะห์ข้อมูล	8
บทที่ 4.....ผลการศึกษา	9
1. จำนวนและข้อมูลทั่วไปของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์	9
2. ผลการตรวจหาปริมาณไวรัส	9
3. ผลการตรวจหาตำแหน่งการกลายพันธุ์และการดื้อยาต้านไวรัส	14
บทที่ 5....สรุปผลและวิจารณ์	17
เอกสารอ้างอิง	20

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สารเรืองแสงที่ใช้สำหรับงานโฟลไซโทเมทรี่ 4
ตารางที่ 2. โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาประชากรย่อยของลิมโฟซัยท์ 5
ตารางที่ 3 ผลค่า precision (Within run) ของการตรวจวัดค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของเครื่อง CyFlow® Counter (Partec) 11
ตารางที่ 4 ผลการตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วย จำนวน 228 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง CyFlow® counter (Partec) และเครื่อง BD FACSCount™ 13

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าร้อยละ และค่า สัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง BD FACSCount™ ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง 10

รูปที่ 2 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าร้อยละ และค่า สัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง Beckman CoulterEpics-XL ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 3 แห่ง 12

รูปที่ 3 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง Beckman Coulter FC500 ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง 13

รูปที่ 4 การวิเคราะห์Bland-Altman bias plot ของค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ระหว่าง วิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วย เครื่อง BD FACSCount™ ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล2 แห่ง 14

รูปที่ 5 การวิเคราะห์Bland-Altman bias plot ของค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ระหว่าง วิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วย เครื่อง Epics XL ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 3 แห่ง 15

รูปที่ 6 การวิเคราะห์Bland-Altman plot ของค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ระหว่างวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟล ไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง FC 500 ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง 16

บทที่ 1
บทนำ

ความเปนมาและความสำคัญของการศึกษา

เอดส์ หรือ กลุ่มอาการภูมิคุ้มกันเสื่อม (Acquired Immune Deficiency Syndrome - AIDS) เป็นโรคของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (human immunodeficiency virus, HIV) ทำให้ผู้ป่วยมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องเสี่ยงต่อการติดเชื้อฉวยโอกาส และการเกิดเนื้องอกบางชนิด การติดเชื้อเอชไอวีทำให้เกิดพยาธิสภาพมากมายในผู้ป่วย เซลล์เป้าหมายที่สำคัญของเชื้อเอชไอวีที่เข้าไปเจริญเติบโตและแบ่งตัวทำลายเซลล์ คือเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4[1, 2] จะทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือที่เรียกว่าโรคเอดส์ในที่สุด การลดจำนวนลงของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 เป็นตัวบ่งชี้ถึงความรุนแรงในผู้ป่วยเป็นอย่างดี ดังนั้นการตรวจปริมาณเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 เป็นสิ่งจำเป็นในการติดตามดูแลผู้ติดเชื้อเอชไอวี เพราะช่วยให้สามารถประเมินระยะของโรคติดเชื้อเอชไอวี ความเสี่ยงของการเกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาส พิจารณาให้ยาป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาส พิจารณาเริ่มการรักษาด้วยยาต้านไวรัส และติดตามผลการรักษา [3]

กระทรวงสาธารณสุข ได้ดำเนินโครงการการเข้าถึงบริการยาต้านไวรัสเอดส์ระดับชาติ สำหรับผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ ในสถานพยาบาลภาครัฐและภาคเอกชน มากกว่า 900 แห่งทั่วประเทศ โดยได้มีนโยบายเร่งรัดขยายการดูแลให้ผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยเอดส์เข้าถึงบริการยาต้านไวรัสตั้งแต่ปีงบประมาณ 2545 เป็นต้นมา สามารถให้บริการผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์มากกว่า 50,000 ราย,[4] ในปีงบประมาณ 2548 กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข โดยสำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ได้มีนโยบายในการให้การดูแลรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ด้วยยาต้านไวรัสเอดส์สูตรพื้นฐาน มาเป็นระยะเวลากว่า 3 ปี จึงสามารถให้การดูแลรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์อย่างครอบคลุมทั่วทั้งประเทศ และได้ดำเนินการเตรียมความพร้อมการให้บริการ การดูแลรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ด้วยยาต้านไวรัสเข้าสู่ระบบหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า และการกำหนดทิศทางการดำเนินงานร่วมกับสำนักงานหลัก ประกันสุขภาพแห่งชาติ โดยมีแนวทางในการเตรียมความพร้อมในการบริหารจัดการยาต้านไวรัสเอดส์ ในชุดสิทธิประโยชน์ในระบบหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า [5] โดยให้มีการเตรียมความพร้อมอย่างเป็นขั้นเป็นตอนมาเป็นระยะ ๆ จนในปัจจุบันได้เข้าสู่ระบบหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้ามีผู้ป่วยสะสมรับประทานยาต้านไวรัสจนถึงสิ้นปี 2554 มีประมาณ 173,010 ราย[6] นอกจากผู้ป่วยในในโครงการหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้าแล้ว ยังมีผู้ป่วยจากโครงการอื่นอีก เช่น ประกันสังคม โครงการ NAPHA Extension เป็นต้น ซึ่งรวมแล้วจะมีผู้ป่วยกินยาทั้งหมดประมาณ 221,797 ราย ในกระบวนการรักษาผู้ป่วยนี้จะต้องรับการตรวจหาปริมาณเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ทุก ๆ 6 เดือน เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 คือ โฟลไซโทเมทรี (flow cytometry) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 เนื่องจากมีความถูกต้อง แม่นยำสูง เครื่องมือที่ใช้คือเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ (flow cytometer) แม้จะมีราคาแพง แต่ก็สามารถใช้ตรวจตัวอย่างได้จำนวนมาก (high sample throughput) และสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้หลากหลาย แต่การตรวจนับปริมาณเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 โดยวิธีโฟลไซโทเมทรีค่อนข้างยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง ต้องคำนึงถึงค่าบำรุงรักษาเครื่องมือ และต้องมั่นใจว่าผู้ปฏิบัติงานได้รับการฝึกฝนมาเป็นอย่างดี จึงจำกัดอยู่เฉพาะในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องตรวจรุ่นใหม่ที่ใช้งานง่ายขึ้น มีขนาดเล็กลง สามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวก ซึ่งทำให้สถานการณ์

เปลี่ยนไป การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินเครื่องโฟลไซโทเมทรีสำหรับตรวจหาปริมาณเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 แบบ Single-Platform ชนิดใหม่ (เครื่อง CyFlow® Counter) โดยอาศัยหลักการวัดปริมาตรของตัวอย่างตรวจ (single-platform volumetric flow cytometry) เครื่องชนิดนี้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Partec ประเทศเยอรมันนี ซึ่งได้ถูกพัฒนาขึ้นมาให้ใช้งานได้ง่าย มีราคาถูก และมีค่าบำรุงรักษาเครื่องต่ำ เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ทั้งค่าร้อยละ (%CD4) และจำนวนสัมบูรณ์ (absolute CD4 count) ในตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ เปรียบเทียบกับวิธีโฟลไซโทเมทรีแบบ Dual-Platform (Dual-Platform flow cytometry) ที่นิยมใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดหาปริมาณของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 และเป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย

วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินเครื่องตรวจโฟลไซโทเมทรีสำหรับตรวจหาปริมาณเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 แบบ Single-Platform ชนิดใหม่ (เครื่อง CyFlow® Counter) เปรียบเทียบกับวิธีโฟลไซโทเมทรีแบบ Dual-Platform (Dual-Platform flow cytometry) ที่นิยมใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดหาปริมาณของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 และเป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

CyFlow® Counter คือราคาเครื่องและน้ำยา มีราคาถูกกว่าเครื่องตรวจชนิดอื่น เครื่องมีขนาดเล็ก เคลื่อนย้ายได้ง่าย การดูแลบำรุงรักษาต่ำ สามารถติดตั้งใช้งานในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีสิ่งจำเป็นพื้นฐานของห้องปฏิบัติการทั่วไปและไม่ต้องใช้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ต้องมีความชำนาญพิเศษเฉพาะด้าน ผลการประเมินเครื่อง CyFlow® Counter ในห้องปฏิบัติการ 7 แห่งในการศึกษานี้ ที่ให้ผลเทียบได้กับวิธีมาตรฐานไฟลไซโทเมทรี่ แสดงถึงความเหมาะสมในการใช้เครื่อง CyFlow® Counter ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลระดับต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีอย่างครอบคลุมและมีประสิทธิผลต่อไป.

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

โฟลไซโทมิเตอร์ (Flow Cytometer)

การวัดหาค่าระดับของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4 ในผู้ติดเชื้อเอช ไอ วี และผู้ป่วยเอดส์นั้น จะเป็นการวัดเพื่อหาจำนวนเซลล์สัมบูรณ์ของเม็ดเลือดขาวชนิด CD4 (absolute CD4) อัตราร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4 และอัตราส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4 ต่อ CD8 ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจวัดหาค่าดังกล่าว เรียกว่า “**โฟลไซโทมิเตอร์**”

หลักการของโฟลไซโทมิเตอร์

การทำงานของโฟลไซโทมิเตอร์อาศัยการวัดเซลล์ที่กำลังไหลอยู่ ซึ่งจะวัดปริมาณของสารเรืองแสงที่เปล่งบนผิวเซลล์ หรือภายในเซลล์ขณะที่ไหลผ่านทางพรวย (nozzle) ของเครื่อง เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ในอัตราความเร็ว 500-1000 เซลล์/วินาที เมื่อเซลล์ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ แสงที่กระทบเซลล์จะเกิดการหักเหแสงเป็น 2 ทิศทาง ในตัวเครื่องจะมีตัวมารับการหักเหของแสง เรียกว่า “Detector” ซึ่งจะวัดค่าการหักเหของแสงเป็นมุมแคบทางด้านหน้าทำให้สามารถบอกขนาดเซลล์ได้ และวัดค่าการหักเหของแสงที่ออกจากเซลล์จะทำให้สามารถวัดส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ จากนั้นเครื่องก็จะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า และส่งข้อมูลไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อประมูลผลออกมา

วิธีการวัดเซลล์ของโฟลไซโทมิเตอร์

การวัดเซลล์ของเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์จวัดเซลล์โดยอาศัยขนาด (size) ความเข้มหรือความหนาแน่นภายในเซลล์ (granularity) และการการย้อมด้วยสารเรืองแสง (fluorescence) ขนาดของเซลล์เกิดจากแสงเลเซอร์ที่กระทบเข้ากับเซลล์เกิดเป็นเงาของเซลล์ ขนาดของเงาจะเป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับขนาดของเซลล์เช่น เซลล์โมโนซัยท์มีขนาดโตกว่าเซลล์ลิมโฟซัยท์ FSC จึงมากกว่า เรียกแสงที่ทำให้เกิดเงาของเซลล์นี้ว่า Forward Light Scatter (FSC) ส่วนความเข้มข้นของเซลล์เกิดจากแสงเลเซอร์ที่กระทบเข้ากับเซลล์แล้วหักเห (Refraction) ออกมาจากภายในเซลล์เรียกแสงที่หักเหออกจากเซลล์นี้ว่า 90 องศา Light หรือ Side Scatter (SSC) เซลล์ซึ่งมี granularity ภายในเซลล์มากจะมีการหักเหของแสงมาก เช่น เซลล์แกรนูโลซัยท์มี granule ในเซลล์มากจึงมี SSC สูงกว่าเซลล์โมโนซัยท์และลิมโฟซัยท์ และเซลล์ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสงอาจจะเป็นสารเรืองแสงอย่างเดียวหรือสารเรืองแสงที่มีแอนติบอดีเชื่อมติดอยู่เมื่อกระทบเข้ากับแสงเลเซอร์ เช่น แสงเลเซอร์จากแหล่งกำเนิดพลังงานของแสงที่มีขนาดความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร จะเกิดการดูดซับพลังงานจากแสงเกิดการสั่นและเปล่งแสงเรืองสีออกมาด้วยขนาดคลื่นของแสงที่ยาวขึ้น เช่น ถ้าสารเรืองแสงเป็น Fluorescein Isothiocyanate (FITC) ก็จะได้คลื่นที่เปล่งออกมาที่ 530 นาโนเมตร เราสามารถเลือกสารเรืองแสงให้ตรงกับชนิดของงานที่ประยุกต์ใช้ทางโฟลไซโทเมทรี่ โดยเลือกใช้สารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สารเรืองแสงที่ใช้สำหรับงานโฟลไซโทเมทรี่

Fluorochrome	Excitation(nm)	Emission(nm)	Laser Type	Applications
Fluorescein	495	520	Argon	Phenotypic analysis
Phycoerythrin	495	575	Argon	Phenotypic analysis
Tricolour	488	650	Argon	Phenotypic analysis
Coumarin	357	460	Argon	Phenotypic analysis
Allophycocyanin	630	660	Helium-Neon	Phenotypic analysis
Cascade Blue	350	480	Argon	Phenotypic analysis
Hoechst 33342	350	470	Argon	DNA analysis/Apoptosis
Hoechst 33258	350	475	Argon	DNA analysis / chromosome staining
DAPI	372	456	Argon	DNA
Chromomycin A3	457	600	Argon	DNA analysis /chromosome staining
Propidium Iodide	495	637	Argon	DNA analysis
Ethidium Bromide	493	620	Argon	DNA analysis
Acridine Orange	503	530/640	Argon	DNA, RNA
Fluorescein diacetate	488	530	Argon	Live / dead discrimination
SNARF-1	488	530-640	Argon	pH measurement
Indo-1	349	425/490	Argon	Calcium flux measurement
Fluo-3	488	530	Argon	Calcium flux measurement
Rhodamine 123	515	580	Argon	Mitochondria
To-Pro-3	642	661	Helium-Neon	Live / Dead discrimination, DNA staining

วิธีการเตรียมเซลล์

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ให้เจาะใส่สารกันเลือดแข็งตัว เช่น EDTA, ACD หรือ heparin ควรเก็บเลือดที่อุณหภูมิห้อง และควรทำ CBC ภายในเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับการย้อมเซลล์ในตัวอย่างเลือดควรทำภายใน 24-30 ชั่วโมง มีรายงานว่าค่าที ลิมโฟซัยท์ (CD3) นั้นจะผิดแปลกจากเดิมถ้าเก็บตัวอย่างเลือดไว้นานเกินไป หรือเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดนั้นให้ใช้วิธีทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า Whole blood lysis (WBL) โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ควรติดฉลากด้วยสารเรืองแสง โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นแอนติบอดีชนิดย้อม 2 สี ซึ่งแสดงในตารางที่ 2 หลังจากการเตรียมเซลล์ให้นำมาอ่านด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

ตารางที่ 2 โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาประชากรย่อยของลิมโฟซัยท์

	mAb Combination (FITC/PE)	Reactive Target cells
1	CD45/CD14	Lymphocytes
2	IgG1/IgG2	Isotype control
3	CD3/CD4	T cells and helper inducer T cells
4	CD3/CD8	T cells and cytotoxic suppressor T cells
5	CD3/CD19	T cells and B cells
6	CD3/CD16+CD56	T cells and natural killer cells

ชนิดของเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์

เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์มีอยู่หลายบริษัทที่ผลิตขึ้น และนำมาใช้ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และประยุกต์ใช้กับงานด้านต่าง ๆ อาทิเช่น การคัดเลือกเซลล์ (cell sorting) การวัดแอนติเจนบนผิวเซลล์ (surface antigens) การวิเคราะห์ดีเอนเอเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็ง เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ในประเทศไทย สามารถประยุกต์ใช้ได้กับงานเหล่านี้ ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของเครื่องได้ตามการใช้งานของแต่ละบริษัทได้ดังนี้

1. บริษัทเบคตันดิคคินสัน จำกัด
   1.1 **FACScan** เป็นเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์แบบ 3 สีได้
   1.2 **FACSCalibur** เป็นเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์แบบอัตโนมัติ สามารถวิเคราะห์แบบ 4 สี และคัดเลือกเซลล์มาศึกษาได้
   1.3 **FACSVantage** เป็นเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์แบบอัตโนมัติขนาดใหญ่ สามารถวิเคราะห์แบบ 5 สี และคัดเลือกเซลล์มาศึกษาได้ โดยการติดตั้งเลเซอร์ 3 ตัว
2. บริษัท Coulter จำกัด
   2.1 COULTER® ALTRAS™ and HyPerSort ™ เป็นเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ที่สมารถตรวจวัดและวิเคราะห์ตัวอย่างที่ย้อมด้วยสารเรืองแสงถึง 6 สี และสามารถคัดเลือกเซลล์ด้วยอัตราความเร็ว 10,000-15,000 เซลล์/วินาที และจะได้สูงถึง 30,000 เซลล์/วินาที เมื่อใช้ร่วมกับ HyPerSort ™ ส่วนของโปรแกรมจะทำงานภายใต้ระบบปฏิบัติการวินโดว์
   2.2 COULTER® EPICS® XL/XL-MCL เป็นเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ที่สมารถตรวจวัดและวิเคราะห์ตัวอย่างที่ย้อมด้วยสารเรืองแสงถึง 4 สี
3. บริษัท Cytomation ผลิตเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย เครื่องใช้เลเซอร์ 3 ตัว มีระบบคัดเลือกเซลล์ ควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่ทำงานภายใต้ระบบปฏิบัติการวินโดว์ 95 หรือ NT คือ **MoFlo XLS**
4. บริษัท Partec GmbH ประเทศเยอรมัน ผลิตเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ซึ่งมีหลายพารามิเตอร์ โดยใช้เลเซอร์และ arc lamp ภายในเครื่องจะมีส่วนของการประมวลผลรวมอยู่ คือ คอมพิวเตอร์เพนเทียม

II 300 MHz พร้อมโปรแกรมที่ทำงานภายใต้ระบบปฏิบัติการวินโดว์ รุ่นที่ผลิตมีหลายรุ่น แต่รุ่นที่น่าใช้ คือ

4.1 **PAS และ PAS-III** ใช้งานทางด้าน Immunophenotyping การวิเคราะห์วงจรของเซลล์, ศึกษาอัตราการตายของเซลล์ (apoptosis) การวิเคราะห์ แบคทีเรียและยีสต์ การวัด ploidy การคัดเลือกเซลล์และสเปอร์ม

4.2 **CCA-I and CCA-II** ใช้งานทางด้านพยาธิวิทยาและเซลล์วิทยา ในการวิเคราะห์ดีเอนเอ เซลล์มะเร็ง โครโมโซม ทางจุลชีววิทยา พิษวิทยา เภสัชวิทยา หรือทางห้องปฏิบัติการอาหารและเครื่องสำอางค์

โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

โปรแกรมที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลโฟลไซโทเมทรี่ ส่วนใหย่จะเป็นโปรแกรมที่มีมากับเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ของแต่ละบริษัท เช่น เครื่อง FACScan จะเป็นโปรแกรมที่ทำงานบนเครื่องฮิวเล็ตแพคการ์ดทำงานภายใต้ภาษาปาสคาล 3.1 ได้แก่ Lysis II, SimulSET หรือบนเครื่องแมคอินทอช ได้แก่ CELLQuest, FACSComp, ModFit LT เป็นต้น ต่อมาจึงมีผู้เขียนโปรแกรมขึ้นมาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยสนับสนุนการทำงานทุกระบบปฏิบัติการ มีทั้งลักษณะให้ใช้ฟรีและเป็นแบบเชิงพาณิชย์ให้เลือกใช้ตามความต้องการ ตัวอย่างโปรแกรมเหล่านี้สมารถเข้าไปหามได้ในแหล่งข้อมูลโฟลไซโทเมทรี่ที่จะกล่าวต่อไป

1. โปรแกรมที่ทำงนภายใต้ระบบปฏิบัติการวินโดว์ (windows 3.1, 3.11, windows 95, windows NT หรือ windows ภายใต้ระบบปฏิบัติการ OS/2) ตัวอย่างเช่น **WinMDI** version 2.5 ของ Joe Trotter ซึ่งใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลโฟลไซโทเมทรี่ ทำงานเหมือนกับโปรแกรม Lysis II
2. โปรแกรมที่ทำงานบนระบบปฏิบัติการบนเครื่องแมคอินทอช
   2.1 **FCS Assistant** ของ Ray Hicks เป็นโปรแกรมที่ใช้แปลงไฟล์ข้อมูลของเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ทุกเครื่องให้สามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลบนเครื่องแมคอินทอชได้ ชุดโปรแกรมล่าสุดคือ 0.55w (18 พฤษภาคม 2541)
   2.2 **FCSM Artist** ของ Michio Ono เป็นโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลโฟลไซโทเมทรี่ (FCS Files) ปัจจุบันอยู่ภายใต้การพัฒนา ชุดโปรแกรมทดสอบล่าสุดคือ 0.48d77 (7 มีนาคม 2540)
   2.3 **HPtoMac** เป็นโปรแกรมที่ใช้อ่านไฟล์ข้อมูลโฟลไซโทเมทรี่ของเครื่องฮิวเล็ตแพคการ์ดบนเครื่องแมคอินทอช

บทที่ 3
วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

ตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวี/ผู้ป่วยเอดส์ ที่ส่งตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ณ ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลตำรวจ กรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลเลย โรงพยาบาลสระแก้ว โรงพยาบาลกาฬสินธุ์ โรงพยาบาลชัยภูมิ โรงพยาบาลพระนครศรีอยุธยา และโรงพยาบาลเกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 580 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างเลือดและวิธีส่ง

โรงพยาบาลจัดเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่ม/ผู้ติดเชื้อเอชไอวี/ผู้ป่วยเอดส์ โดยเจาะเลือดใส่ในหลอดเก็บเลือดสูญญากาศที่มีสารกันเลือดแข็ง K_3EDTA จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วส่งไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการตรวจภายใน 6 ชั่วโมง

ขั้นตอนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 7 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลตำรวจ จังหวัดกรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลเลย โรงพยาบาลสระแก้ว โรงพยาบาลกาฬสินธุ์ โรงพยาบาลชัยภูมิ โรงพยาบาลพระนครศรีอยุธยา และโรงพยาบาลเกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี ทำการตรวจวัดค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยด้วยวิธีมาตรฐาน flow cytometry

1. โรงพยาบาลเลย และโรงพยาบาลกาฬสินธุ์ เปรียบเทียบวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยครื่อง BD FACSCount™
2. โรงพยาบาลสระแก้ว โรงพยาบาลพระนครศรีอยุธยา และดรงพยาบลตำรวจ เปรียบเทียบวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยครื่อง Coulter EPIC-XL
3. โรงพยาบาลเกาะสมุยและโรงพยาบาลชัยภูมิ เปรียบเทียบวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยครื่อง Coulter FC-500

น้ำยาที่ใช้

1. ชุดน้ำยา BD FACSCount CD4 reagent จะวัดค่าค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 และค่าร้อยละของ CD4 โดยตรวจวัดด้วยเครื่อง BD FACSCount™
2. น้ำยา Cyto-STAT TriCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 และ IMMUNOPREP Reagent โดยเทคนิค Lysed/No wash ตรวจด้วยเครื่องEPIC-XL และ FC 500 Flow Cytometer (Beckman Coulter) และคำนวณหาค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 โดยใช้ค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (WBC count) และค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ (% lymphocyte) ที่ได้จาก

เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ (Hematology analyzer) ของแต่ละโรงพยาบาลที่ส่งตัวอย่างเลือดมาตรวจ

3. ชุดน้ำยา CD4% easy count kit (CD4-PE/CD45-DY647) ตรวจด้วยวิธี single-platform volumetric flow cytometry ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® Counter (Partec)

การควบคุมคุณภาพ

เพื่อควบคุมคุณภาพของผลการทดสอบ เครื่อง BD FACSCount™ ที่ใช้ตรวจจะถูกควบคุมคุณภาพด้วย BD FACSCount™ Control Kit และ BD Multicheck™ Control ส่วนเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ Coulter EPIC-XL และ FC500 (Beckman Coulter) ที่ใช้ตรวจจะถูกควบคุมคุณภาพโดยใช้ Flow-Check Fluorospheres, Flow-Set Fluorospheres และ IMMUNO-TROL Control Cells (Backman Coulter) สำหรับเครื่อง CyFlow® Counter (Partec) จะควบคุมคุณภาพโดยใช้ Count Check Bead Green และประเมินความแม่นยำของเครื่อง (Assay precision) โดยใช้ CD4 normal stabilized whole blood samples เพื่อศึกษาค่า Within run variation

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์และแปรผลข้อมูลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม โดยการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของจำนวนเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของทั้งสองวิธี ด้วย Linear regression analysis และเปรียบความแตกต่างของค่าทั้งสองวิธีโดยใช้ Blend-Altman statistical bias method โดยกำหนดช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% (95% Confidence Interval) โดยใช้โปรแกรม MedCalc (MedCalc Software bvba, Belgium)

บทที่ 4
ผลการศึกษา

ผลการตรวจวัดค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจำนวน 550 ตัวอย่าง ด้วยวิธี single-platform volumetric flow cytometry โดยตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® Counter (Partec) เปรียบเทียบผลการตรวจกับวิธีมาตรฐาน flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง FACSCount (Becton Dickinson), EPIC-XL และ FC-500 Flow Cytometer (Beckman Coulter) ได้ผลการศึกษาดังนี้

1. การทดสอบความแม่นยำของเครื่อง CyFlow® Counter (Partec) โดยทำการตรวจวัดแบบ Whithin ด้วยตัวอย่างเลือด Stabilized whole blood samples พบว่าเครื่องดังกล่าวให้ค่าการรายงานผลที่ถูกต้องเป็นที่ยอมรับได้ โดยมีค่า %CV น้อยกว่าร้อยละ 10 ดังแสดง ไว้ใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลค่า precision (Within run) ของการตรวจวัดค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของเครื่อง CyFlow® Counter (Partec)

ลำดับ	หน่วยงาน	%CD4			Absolute CD4		
		Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
1	โรงพยาบาลเลย	25.16	0.44	1.76	471	21.71	4.61
2	โรงพยาบาลกาฬสินธุ์	22.37	0.48	2.15	398	23.2	5.83
3	โรงพยาบาลสระแก้ว	36.81	0.31	0.83	996	45.95	4.61
4	โรงพยาบาลพระนครศรีอยุธยา	31.91	0.84	2.64	572	14.18	2.48
5	โรงพยาบาลตำรวจ	56.07	1.6	2.85	2097	134.29	6.40
6	โรงพยาบาลเกาะสมุย	45.26	1.14	2.52	1001	66.49	6.65
7	โรงพยาบาลชัยภูมิ	31.91	0.84	2.64	366	11.35	3.10

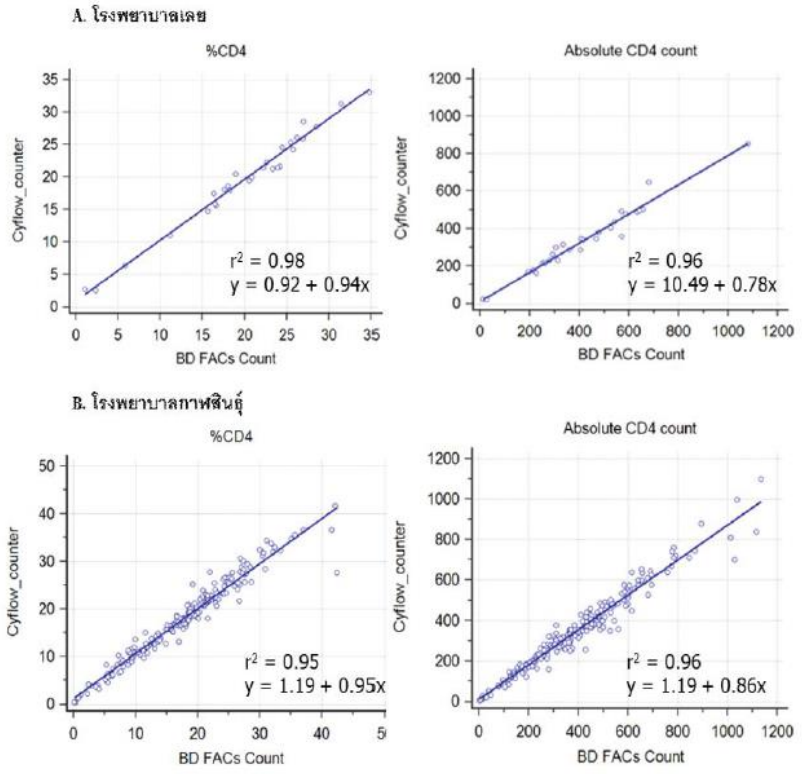
2. การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจนับจำนวนเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจำนวน 580 ตัวอย่าง ที่ตรวจด้วยวิธี Single-platform volumetric method ด้วยเครื่อง CyFlow® counter (Partec) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยแยกตามชนิดเครื่องมาตรฐานดังนี้

   2.1 เปรียบเทียบวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยครื่อง BD FACSCount™ พบว่ามีค่าเฉลี่ยและช่วงค่าที่ตรวจวัดได้ใกล้เคียงกันมากดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจของทั้ง 2 วิธี ด้วย Linear regression analysis พบว่ามีความสัมพันธ์กันสูงมาก โดยการศึกษาในโรงพยาบาลเลย พบความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า $r = 0.99$; $r^2 = 0.98$ และความสัมพันธ์ของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์

ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.98; r^2 = 0.96 การศึกษาในโรงพยาบาลกาฬสินธุ์พบความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มี r = 0.98; r^2 = 0.95 และความสัมพันธ์ของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.98; r^2 = 0.96 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วย จำนวน 228 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง CyFlow® counter (Partec) และเครื่อง BD FACSCount™

ลำดับ	หน่วยงาน	จำนวน	CD4 Count	Mean±SD		r	r^2
				CyFlow® counter	BD FACSCount™		
1	โรงพยาบาลเลย	28	%CD4	19.85±7.53	20.22±7.83	0.99	0.98
			Absolute CD4	337.71±177.27	419.21±222.6	098	0.96
2	โรงพยาบาลกาฬสินธุ์	200	%CD4	18.20±8.03	17.94±8.26	0.98	0.95
			Absolute CD4	347.27±195.58	391.54±222.03	0.98	0.96

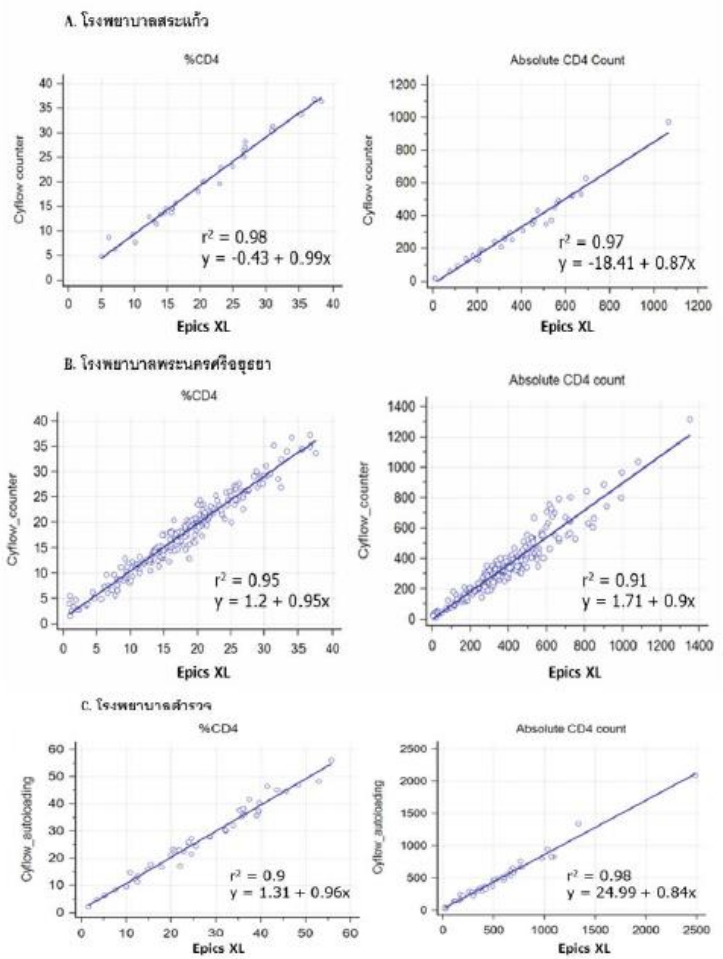


รูปที่ 1. การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง BD FACSCout™ ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง

2.2 เปรียบเทียบวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง Coulter EPIC-XL พบว่ามีค่าเฉลี่ยและช่วงค่าที่ตรวจวัดได้ ใกล้เคียงกันมาก ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจของทั้ง 2 วิธี ด้วย Linear regression analysis พบว่ามีความสัมพันธ์กันสูง โดยการศึกษาในโรงพยาบาลสระแก้ว พบความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.99; r^2 = 0.98 และความสัมพันธ์ของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.99; r^2 = 0.97 การศึกษาในโรงพยาบาลพระนครศรีอยุธยา พบความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มี r = 0.98; r^2 = 0.95 และความสัมพันธ์ของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.96; r^2 = 0.91 และการศึกษาในโรงพยาบาลตำรวจ พบความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มี r = 0.99; r^2 = 0.97 และความสัมพันธ์ของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.99; r^2 = 0.98 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วย จำนวน 275 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง CyFlow® counter (Partec) และเครื่อง Coulter EPIC-XL

ลำดับ	หน่วยงาน	จำนวน	CD4 Count	Mean±SD		r	r^2
				CyFlow® counter	BC Epics-XL		
1	โรงพยาบาลสระแก้ว	30	%CD4	19.12±9.10	19.80±9.14	0.99	0.98
			Absolute CD4	321.53±200.40	390.1±226.94	0.99	0.97
2	โรงพยาบาล พระนครศรีอยุธยา	200	%CD4	17.85±7.69	17.96±8.00	0.98	0.95
			Absolute CD4	343.11±209.41	380.67±223.18	0.96	0.91
3	โรงพยาบาลตำรวจ	45	%CD4	27.38±13.01	27.17±13.38	0.99	0.97
			Absolute CD4	478.0±363.68	478.22±427.45	0.99	0.98

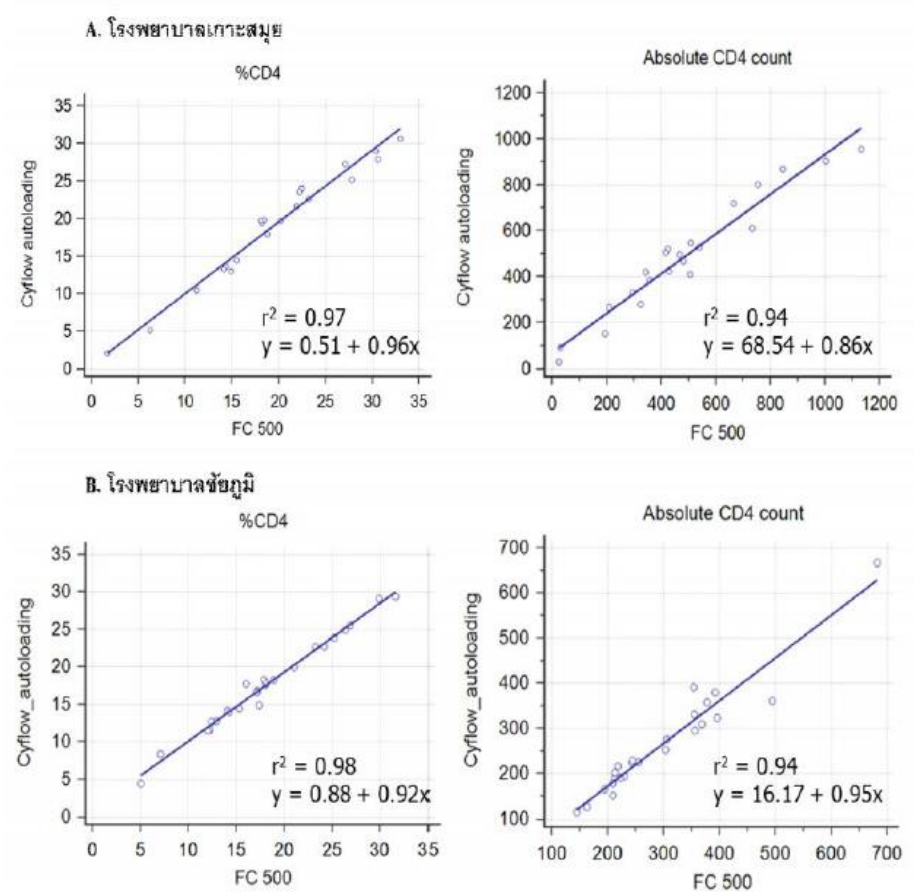


รูปที่ 2. การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง Beckman CoulterEpics-XL ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 3 แห่ง

2.3 เปรียบเทียบวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง Coulter FC-500 พบว่ามีค่าเฉลี่ยและช่วงค่าที่ตรวจวัดได้ ใกล้เคียงกันมาก ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจของทั้ง 2 วิธี ด้วย Linear regression analysis พบว่ามีความสัมพันธ์กันสูง โดยการศึกษาในโรงพยาบาลเกาะสมุยพบความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.98; r^2 = 0.97 และความสัมพันธ์ของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.97; R^2 = 0.94 และการศึกษาในโรงพยาบาลชัยภูมิ พบความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มี r = 0.99; r^2 = 0.98 และความสัมพันธ์ของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่า r = 0.97; r^2 = 0.94 ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 3

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วย จำนวน 45 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Partec CyFlow® counter (Partec) และเครื่อง Backman Coulter FC 500

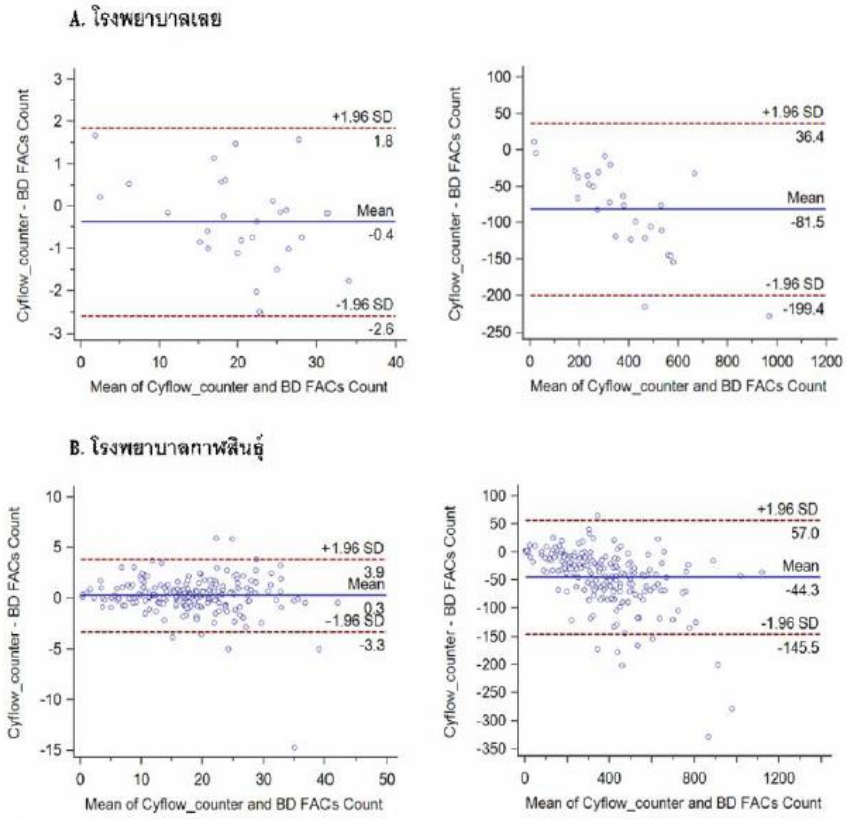
ลำดับ	หน่วยงาน	จำนวน	CD4 Count	Mean±SD		r	r^2
				CyFlow® counter	BC FC 500		
1	โรงพยาบาลเกาะสมุย	22	%CD4	19.29±7.50	19.67±7.73	0.98	0.97
			Absolute CD4	487.27±251.88	485.36±283.23	0.97	0.94
2	โรงพยาบาลชัยภูมิ	25	%CD4	17.60±6.17	18.18±6.66	0.99	0.98
			Absolute CD4	261.68±116.43	293.84±119.12	0.97	0.94



รูปที่ 3. การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าร้อยละ และค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง Beckman CoulterCoulterFC500 ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง

3. ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างเฉลี่ย (mean difference) ด้วย Blend-Altman plotระหว่างวิธี SP volumetric CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีได้ผลดังนี้

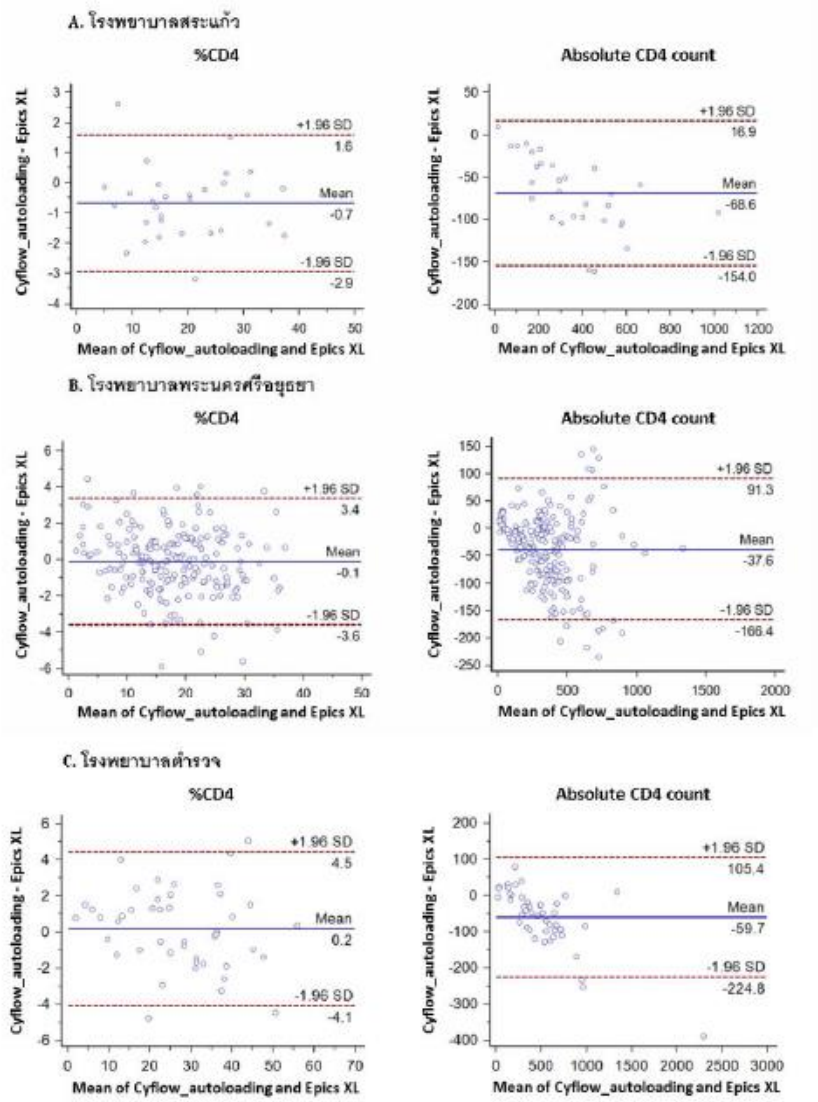
3.1 ระหว่างวิธี SP volumetric CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานที่ตรวจด้วยเครื่อง BD FACSCount™ ของห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง พบว่า ค่าความแตกต่างเฉลี่ยของค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% (95% CI) โดยค่าความแตกต่างเฉลี่ยของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลเลยและโรงพยาบาลกาฬสินธุ์ เท่ากับ -0.4% (95%CI -2.6 to 1.8) และ 0.3% (95%CI -3.3 to 3.9) ตามลำดับสำหรับค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่าความแตกต่างเฉลี่ยเท่ากับ -81.5 cells/μl (95%CI -199.4 to 36.4) และ -44.3 cells/μl (95%CI -145.5 to 57.0) ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4. การวิเคราะห์ Bland-Altman bias plot ของค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ระหว่างวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง BD FACSCount™ ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง

3.2 ระหว่างวิธีSP volumetric CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานที่ตรวจด้วยเครื่อง Epics XL ของห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 3 แห่ง พบว่าค่าความแตกต่างเฉลี่ยของทั้งค่าร้อยละและค่า สัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% (95% CI)

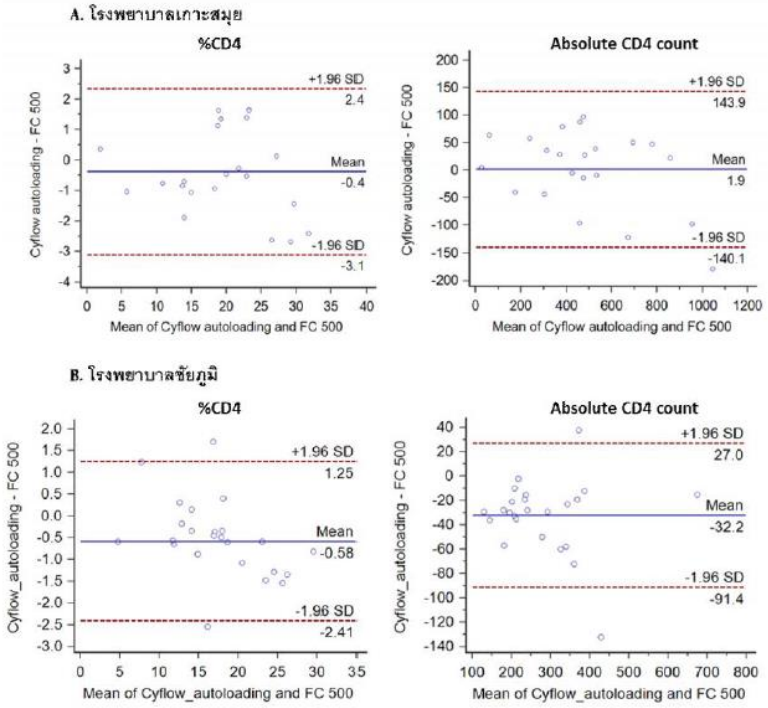
โดยค่าความแตกต่างเฉลี่ยของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสระแก้ว โรงพยาบาลพระนครศรีอยุธยา และโรงพยาบาลตำรวจเท่ากับ -0.7% (95%CI -2.9 to 1.6), -0.1% (95%CI -3.6 to 3.4) และ 0.2% (95%CI -4.1 to 4.5) ตามลำดับสำหรับค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่าความแตกต่างเฉลี่ยเท่ากับ -68.6 cells/μl (95%CI -154.0 to 16.9),-37.6 cells/μl (95%CI -166.4 to 91.3) และ -59.7 cells/μl (95%CI -224.8 to 105.4) ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5. การวิเคราะห์ Bland-Altman bias plot ของค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ระหว่างวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง Epics XL ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 3 แห่ง

3.3 ระหว่างวิธีSP volumetric CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานที่ตรวจด้วยเครื่อง FC 500 ของห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง พบว่า ค่าความแตกต่างเฉลี่ยของค่าร้อยละและค่า

สัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% (95% CI) โดยค่าความแตกต่างเฉลี่ยของค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลเกาะสมุย และโรงพยาบาลชัยภูมิ เท่ากับ -0.4% (95%CI -3.1 to 2.4) และ 0.6% (95%CI -2.4 to 1.3) ตามลำดับสำหรับค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 มีค่าความแตกต่างเฉลี่ยเท่ากับ -1.9 cells/μl (95%CI -140.1 to 143.9) และ -32.2 cells/μl (95%CI -91.4 to 27.0) ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6. การวิเคราะห์ Bland-Altman plot ของค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ระหว่างวิธี SP volumetric flow cytometry ที่ตรวจด้วยเครื่อง CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีที่ตรวจด้วยเครื่อง FC 500 ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่ง

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุป

ในประเทศไทย วิธี DP flow cytometry ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวัดค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์ เพื่อใช้พิจารณาเริ่มให้การรักษาด้วยยาต้านไวรัส และติดตามประเมินผลการรักษา วิธี DP flow cytometry จัดเป็นวิธีที่มีราคาแพงในแง่ของการลงทุนเบื้องต้นด้านเครื่องมือและการบำรุงรักษา อีกทั้งจำเป็นต้องอาศัยผู้ปฏิบัติที่มีความรู้ความชำนาญ และได้รับการฝึกอบรมมาเป็นอย่างดี วิธี DP flow cytometry จึงมักมีใช้จำกัดแต่ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลขนาดใหญ่ที่มีความพร้อมทั้งในด้านเครื่องมือ งบประมาณและบุคลากร และไม่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลขนาดเล็กซึ่งมีข้อจำกัดต่าง ๆ ดังกล่าว สำหรับการตรวจหาค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ของวิธี DP flow cytometry ต้องอาศัยค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (WBC count) และค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ (% lymphocyte) ที่ได้จากเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ (Hematology analyzer) มาคำนวณร่วมกับค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 (%CD4) ที่ได้จากเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ค่าที่ได้จึงอาจมีโอกาสแปรปรวน (variation) ได้สูง ถ้าการควบคุมคุณภาพวิธีการวิเคราะห์โดยเครื่องมือทั้ง 2 ชนิดไม่ดีพอ

การตรวจวัดค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 โดยวิธี SP flow cytometry ได้รับการยอมรับว่ามีความแม่นยำสูงในการตรวจวัดค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 โดยใช้แต่เครื่อง flow cytometer เท่านั้น[8] แต่สำหรับประเทศไทย วิธี SP flow cytometry ยังมีการใช้อย่างจำกัด เพราะต้นทุนของน้ำยาตรวจโดยเฉพาะ standard beads มีราคาสูงมาก (ประมาณ 250-300 บาทต่อการตรวจหนึ่งราย) จากข้อจำกัดที่กล่าวมาวิธีการตรวจหาจำนวนเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ที่เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลขนาดเล็ก จึงควรเป็นวิธีที่มีราคาถูกในแง่ของการลงทุนเบื้องต้นด้านเครื่องมือ มีค่าบำรุงรักษาและต้นทุนน้ำยาตรวจต่ำ สามารถทำการตรวจวัดได้ง่าย และควรเป็นวิธีตรวจวัดแบบ single platform (SP) ที่สามารถตรวจวัดได้ทั้งค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ได้โดยตรง

CyFlow® counter เป็นวิธีที่ใช้ตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 โดยอาศัยหลักการ single platform volumetric flow cytometry วิธีนี้มีการศึกษาประเมินผลทั้งในและต่างประเทศและพบว่ามี ความสัมพันธ์อย่างดีกับวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีทั้งแบบ single- และ dual-platform[4-6] การประเมินผลวิธี CyFlow® counter ในครั้งนี้ได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 7 แห่งที่ใช้วิธีมาตรฐานแยกเป็น 2 วิธี คือ วิธี single–platform และ dual-platform flow cytometry วิธี BD FACSCount เป็นวิธีมาตรฐานแบบ single–platform อาศัยการตรวจวัดค่าสัมบูรณ์โดยเทียบกับจำนวนเม็ด bead เรืองแสงมาตรฐานที่รู้ค่าความเข้มข้นในชุดน้ำยาตรวจ การศึกษาเปรียบเทียบวิธีCyFlow® counter และวิธี BD FACSCount ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล 2 แห่งพบว่า ทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์กันสูงมากทั้งการตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 อย่างไรก็ตามพบว่าวิธี CyFlow® counter ให้ค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 ต่ำกว่าวิธี BD FACSCount โดยค่าความแตกต่างเฉลี่ยของค่า สัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 ของห้องปฏิบัติการ 2 แห่งเท่ากับ -81.5 cells/mm3 (95%CI -199.4 to 36.4) และ -44.3 cells/mm3 (95%CI -145.5 to 57.0) ตามลำดับ โดยตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อเอ็ชไอวี10 รายจาก 228 รายที่มีค่าความ แตกต่างเฉลี่ยของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 ของ 2 วิธี ต่ำเกินช่วง 95% CI พบว่า 9 ราย มีค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 สูงเกิน 500 cells/mm3 ผลดังกล่าวอาจเกิดจากหลักการตรวจวัดค่า

สัมบูรณ์ที่แตกต่างกันของทั้ง 2 วิธีการศึกษา ของ Wadeet al. [6] ได้ประเมินวิธีCyFlow® Counter โดยใช้ชุดน้ำยา CD4 easy count kit เช่นเดียวกับการศึกษานี้เปรียบเทียบกับวิธี BD FACSCount พบว่าได้ผลเช่นเดียวกันโดยมีค่าความแตกต่างเฉลี่ยของค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 เท่ากับ -63 cells/mm3 (95%CI -245 to 250), N =128 และ -133 cells/mm^3 (95%CI -349 to 84), N =51 ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอ็ชไอวีที่มีค่าสัมบูรณ์ของเซลล์CD4 สูงกว่า 500 cells/mm^3

การศึกษาเปรียบเทียบวิธี CyFlow® counter กับวิธีมาตรฐานโฟลไซ โทเมทรีแบบ dual-platform ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลอีก 5 แห่ง ที่ใช้เครื่องโฟลไซ โทมิเตอร์ต่างกัน 2 รุ่น พบว่าวิธี CyFlow® counter และวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมตทรีแบบ dual-platform มีความสัมพันธ์กันสูงมากทั้งการตรวจวัดค่าร้อยละและค่าสัมบูรณ์ของ เซลล์ CD4 แต่พบว่าค่าสัมบูรณ์เซลล์ CD4 จากวิธี CyFlow® counter มีค่าต่ำกว่าวิธีมาตรฐานโฟลไซ โทเมทรีแบบ dual-platform เช่นกัน ผลดังกล่าวนี้พบได้ในการศึกษาอื่นๆ ที่เปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรีแบบ single-platform และ dual-platform [5, 7] ทั้งนี้เป็นผลจากค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 จากวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรี แบบ dual-platform ต้องใช้ค่าจำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell count) และค่าร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์ (%lymphocyte) ที่ได้จากเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติมาใช้คำนวณซึ่งมีความแปรปรวนได้มากเนื่องจากเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติใช้หลักการตรวจที่แตกต่างกันหลายหลักการ[9]

ปัจจุบันกระทรวงสาธารณสุขมีนโยบาย Getting to zero ตามยุทธศาสตร์ป้ องกันและแก้ไขปัญหาเอดส์แห่งชาติ พ.ศ. 2555-2559 ที่กำหนดสู่เป้าหมายที่เป็นศูนย์ 3 ประการ คือ 1) เป้าหมายไม่มีผู้ติดเชื้อเอ็ชไอวีรายใหม่ 2) เป้าหมายไม่มีการเสียชีวิตเนื่องจากโรคเอดส์ และ 3) เป้าหมายไม่มีการตีตราและเลือกปฏิบัติ [10] โดยกำหนดเป้าหมายในการดูแลรักษาในปี 2559 ว่าผู้ติดเชื้อเอ็ชไอวีทุกคนในแผ่นดินไทยได้รับความคุ้มครองทางสังคมและเข้าถึงการดูแลรักษาที่มีคุณภาพอย่างเท่าเทียมกัน การขยายการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อด้วยยาต้านไวรัสให้ครอบคลุมผู้ติดเชื้อมากที่สุดจะช่วยลดการเสียชีวิตจากโรคเอดส์และยังช่วยลดโอกาสการถ่ายทอดเชื้อเอ็ชไอวีจากผู้ติดเชื้อไปยังคู่นอนได้อีกด้วยการดำเนินมาตรการ same day results (SDR) ได้นำมารณรงค์เพื่อใช้ในการตรวจหาผู้ติดเชื้อให้ทราบผลภายในวันเดียว เพื่อช่วยลดจำนวนผู้ที่มารับการตรวจที่จะไม่กลับมาฟังผลการตรวจให้ลดน้อยลงและผู้ที่ทราบผลการตรวจในวันเดียวว่ามีการติดเชื้อเอ็ชไอวีจะได้รับการแนะนำให้เข้าสู่ระบบการดูแลรักษาด้วยยาต้านไวรัสต่อไป เมื่อผลการตรวจค่าสัมบูรณ์ของเซลล์ CD4 ต่ำกว่า 500 cells/mm^3 หรือสูงกว่า 500 cells/mm^3 หากผู้ติดเชื้อสมัครใจ และมีความพร้อมที่จะกินยาต้านไวรัส[11]

โดยปกติโรงพยาบาลที่ส่งตรวจค่าเซลล์ CD4 จะส่งตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อไปตรวจยังห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลแม่ข่ายที่เปิดให้บริการตรวจค่าเซลล์ CD4 ซึ่งจะได้รับผลการตรวจภายใน 3-7 วัน ถ้าหากไม่มีปัญหาในการขนส่งตัวอย่าง และปัญหาทางเทคนิคอื่น ๆ การเพิ่มศักยภาพห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลให้สามารถให้บริการตรวจเซลล์CD4 ได้เอง จะช่วยให้โรงพยาบาลสามารถขยายการดูแลรักษาให้ครอบคลุมผู้ติดเชื้อมากขึ้นและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อด้วยยาต้านไวรัส แต่ทั้งนี้จะต้องไม่กระทบถึงภาระการทำงานของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ต้องให้บริการตรวจอื่น ๆ ตามปกติ รวมทั้งฐานะการเงินของห้องปฏิบัติการนั้น ๆ ข้อดีของ CyFlow® Counter คือราคาเครื่องและน้ำยามีราคาถูกกว่าเครื่องตรวจชนิดอื่น เครื่องมีขนาดเล็กเคลื่อนย้ายได้ง่าย ต้องการการดูแลบำรุงรักษาต่ำ สามารถติดตั้งใช้งานในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีสิ่งจำเป็นพื้นฐานของห้องปฏิบัติการทั่วไป และไม่ต้องใช้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ต้องมีความชำนาญพิเศษเฉพาะด้าน ผลการประเมินเครื่อง CyFlow® Counter ในห้องปฏิบัติการ 7 แห่งในการศึกษานี้ที่ให้ผลเทียบได้กับวิธีมาตรฐาน

ไฟลไซโทเมทรี่ แสดงถึงความ เหมาะสมในการใช้เครื่อง CyFlow® Counter ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลระดับต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อ การดูแลรักษาผู้ติดเชื้อเอ็ชไอวีอย่างครอบคลุมและมีประสิทธิผลต่อไป.

จากผลการศึกษาที่กล่าวมา สรุปได้ว่าวิธี SP volumetric CyFlow® counter system เป็นวิธีการตรวจวัดจำนวนเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด CD4 ที่มีความถูกต้องเทียบได้กับวิธีมาตรฐาน DP flow cytometry ที่นิยมใช้ในประเทศไทย วิธี SP volumetric CyFlow® counter system ใช้เครื่องตรวจวัดขนาดเล็ก จึงมีความเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลขนาดเล็กในต่างจังหวัด ซึ่งในแต่ละวันมีตัวอย่างเลือดส่งตรวจจำนวนไม่มาก (เช่น 20-50 ราย/วัน หรือมากกว่า) อย่างไรก็ตามระบบนี้สามารถติดตั้งอุปกรณ์ชุดเตรียมตัวอย่างอัตโนมัติ (Auto preparation & Autoloading station) เข้ากับเครื่องตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งจะสามารถรองรับในกรณีที่มีตัวอย่างตรวจจำนวนมากได้

เอกสารอ้างอิง

1. Barré-Sinoussi F, ChermannJC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from apatient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983; 220 (4599): 868–871.
2. Galéa P, Chermann JC. HIV as thecause of AIDS and associated diseases.Genetica 1998; 104 (2): 133-42.
3. Centers for Disease Control and Prevention. 1997 revisedguidelines for performing CD4+ T-cell determinations inpersons infected with human immunodeficiency virus (HIV). MorbidMortal Wkly Rep 1997; 46 (No. RR-2): 1–29.
4. Fryland M, Chaillet P, Zachariah R, Barnaba A, Bonte L, Andereassen R. et al. The Partec CyFlow counter could provide an option for CD4+ T-cell monitoring in the context of scaling-up antiretroviraltreatment at the district level in Malawi. Trans R Soc Trop Med Hyg 2006; 100(10): 980-5.
5. Kohreanudom S,Dettrairat S. Evaluation of the Partec single-platform volumetric CyFlow® counter system for determiningpercentage and absolute numbers of CD4 T lymphocytes in HIV/AIDS Thai patients. 2013; 25(1): 1-10.
6. Wade D, Diaw PA, Daneau G, Camara M, Dieye TN, Mboup S, Kestens L. CD4 T-cell enumeration in a field setting: Evaluation of CyFlow counter using the CD4 easy count kit-dry and Pima CD4 systems. PLoS ONE 2013; 8 (Issue 9): e75484.
7. Manasa J, Musabaike H, Masimirembwa C, Burke E, Luthy R, and Mudzori J. Evaluation of the Partec flow cytometer against the BD FACSCalibur system for monitoring immune responses of human immunodeficiency virus-infected patients in Zimbabwe. ClinVaccImmunol 2007; 14: 293–298.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for performing single-platform absolute CD4_ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Morbid Mortal Wkly Rep 2003; 52(No. RR02):1–13.
9. Simson E and Groner W. Variability in absolute lymphocyte counts obtained by automated cell counters. Cytometry (Clinical Communications Cytometry) 1995; 22: 26-34.

10. คณะกรรมการแห่งชาติว่าด้วยการป้องกันและแก้ไขปัญหาเอดส์. ยุทธศาสตร์ป้องกันและแก้ไขปัญหาเอดส์แห่ง ชาติ พ.ศ. 2555-2559. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 2555.
11. สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค. แนวทางการตรวจรักษาและป้ องกัน การติดเชื้อเอชไอวี ประเทศไทย ปี 2557 ฉบับพกพา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ. 2557.