



Platelet estimation factor สำหรับ platelet count ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field Number (Fn) 22

สกลเดช ไชไพรวรรณ¹

¹ โรงพยาบาลสกลนคร ตำบลธาตุเชิงชุม อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร รหัสไปรษณีย์ 47000

สกลเดช ไชไพรวรรณ. (2566). Platelet estimation factor สำหรับ platelet count ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field Number (Fn) 22. วารสารวิทยาการสิ่งแวดล้อมไทย ปีที่ 6(3), 2566 : 12 – 18.

บทคัดย่อ

Platelet หรือเกล็ดเลือดนั้นมีขนาดเล็กและเปราะบางทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ในทุกขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ทั้ง Preanalytical Analytical และ Postanalytical แม้ว่าปัจจุบันจะมีเครื่องตรวจวิเคราะห์และเทคโนโลยีที่ทันสมัย แต่ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยายังคงต้องตรวจสอบ blood smear และทำ Platelet estimation เทียบกับเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทุกครั้งก่อนรายงานผลเสมอ ซึ่งต้องรายงานทั้งขนาด รูปร่าง ปริมาณ และการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย หากผู้ปฏิบัติข้ามขั้นตอนดังกล่าวไป ผลการนับเกล็ดเลือดอาจไม่ถูกต้องหรือเกิดผลสูงปลอมหรือต่ำปลอมได้

กระบวนการ platelet estimation มีความสำคัญอย่างยิ่ง ปัจจุบันกล้องจุลทรรศน์มีขนาดวงกล้องที่แตกต่างกัน เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติก็มีหลากหลาย ก่อนจะทำการตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดจึงควรหาค่า platelet estimation factor และหาค่าความสัมพันธ์ทางสถิติ correlation ระหว่างค่าเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติและกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ และจากค่าทางสถิติ พบว่ามีความสัมพันธ์กันทางสถิติสูง $r = 0.989$ จำนวนเกล็ดเลือดจากสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ pair t-test $p = 0.017$ ($p < 0.05$) และค่าความสัมพันธ์ Intra-class Correlation Coefficient (ICC) อยู่ในเกณฑ์สูงคือ 1.00 และ 0.989 ($ICC > 0.75$)

Platelet estimation ช่วยให้ผลการตรวจวิเคราะห์ถูกต้องและเป็นการทวนสอบ (verification) เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ทำให้เราทราบได้ทันทีว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติในขณะนั้นมีความผิดปกติหรือพร้อมใช้ในงานประจำวันหรือไม่

คำสำคัญ : เกล็ดเลือด, การประมาณค่าด้วยการคำนวณ, ขนาดวงกล้องจุลทรรศน์, แผ่นฟิล์มเลือดที่ย้อมสี, การทวนสอบ



Platelet estimation factor for platelet count by Field Number microscope (Fn) 22

Sakondat kaipaiwan¹

¹ Sakon Nakhon Hospital, That Choeng Chum, Mueang Sakon Nakhon District, Sakon Nakhon 47000

Sakondet kaipraiwan. (2566). Platelet estimation factor for platelet count by Field Number microscope (Fn) 22. Thai Journal of Environmental Studies Vol. 6(3), 2023 : 12 – 18.

Abstract

Platelets are small and fragile, causing changes in all stages of the analysis, both preanalytical, analytical and postanalytical. Although there are modern analyzers and technologies, hematology laboratories still have to check blood smear and platelet estimation against an automatic analyzer before always reporting results. If the practitioner skips the step, platelet count results may be inaccurate or false high or false low results can occur.

The platelet estimation process is of great importance. Currently, microscopes have different the field number, before performing platelet analysis, it is important to determine the platelet estimation factor and determine the statistical correlation between the automatic analyzer and the microscope used. The paired t-test showed significant difference between the two methods. $p = 0.017$ ($p < 0.05$) and the Intra-class Correlation Coefficient (ICC) is 1.00 and 0.989 ($ICC > 0.75$).

Platelet estimation from blood smear helps to ensure accurate results and verify the automated analyzers, it should be method for a daily routine laboratory test

Keyword: Platelet, Estimation factor, Field number, Blood smear, Verification



1. บทนำ

ในการตรวจความสมบูรณ์ของเลือดหรือ complete blood count (CBC) นั้น พารามิเตอร์ที่ทุกห้องปฏิบัติการยังมีปัญหาในการควบคุมคุณภาพและรายงานผลก็คือ เกล็ดเลือด (platelet) เนื่องจากเกล็ดเลือดมีขนาดเล็กกว่าเซลล์อื่น ๆ มาก และยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลให้รูปร่างและสัณฐานของเกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น ในผู้ป่วยบางรายจำนวนเกล็ดเลือดถูกรบกวนด้วยเศษเซลล์เม็ดเลือดแดง (schistocyte) ทำให้ค่าที่ได้จากการนับเกล็ดเลือดมีปริมาณสูงเกินจริงได้ ตรงกันข้ามในผู้ป่วยบางรายเกล็ดเลือดถูกรบกวนด้วยสารกันเลือดแข็งภายในหลอดเก็บตัวอย่าง ทำให้เกิดภาวะ EDTA-dependent pseudothrombocytopenia (EDTA-PTCP) ซึ่งก็จะทำให้เกล็ดเลือดเกิดการเกาะกลุ่ม (platelet clumping) ค่าที่นับได้ก็จะต่ำเกินจริงนั่นเอง (Hae Lyun Ahn, 2002). หากห้องปฏิบัติการรายงานผลเกล็ดเลือดที่ไม่ถูกต้องออกไป จะส่งผลต่อผู้ป่วยและอาจทำให้การรักษาที่ผิดพลาดได้

การตรวจสอบแผ่นฟิล์มเลือด (blood smear) โดยการทำให้ platelet estimation ถือเป็นขั้นตอนสุดท้ายก่อนการรายงานผล ซึ่งเป็นการยืนยัน ผู้ปฏิบัติเห็นสภาพจริงที่ประกอบอยู่ภายในเลือดผู้ป่วย ซึ่งเครื่องอัตโนมัติในปัจจุบันยังไม่สามารถแยกออกได้ชัดเจน อีกทั้งยังเป็นการทวนสอบกลับเครื่องตรวจอัตโนมัติได้ว่าเกิดความผิดพลาด (random error) ขึ้นในช่วงขณะนั้นหรือไม่

อย่างไรก็ตามการดู blood smear การทำให้ platelet estimation จะเกิดขึ้นได้อย่างถูกต้อง ห้องปฏิบัติการควรมีค่า platelet estimation factor ตามขนาดวงกลองจุลทรรศน์ (Field number) ที่ใช้ประจำห้องปฏิบัติการนั้น ๆ ซึ่งปัจจุบันพบว่าวงกลองจุลทรรศน์ มีขนาดวงกลองที่หลากหลาย ทำให้ factor ที่จะนำมาใช้คำนวณกลับค่าเกล็ดเลือดแตกต่างกันออกไป และควรทำการทวนสอบเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยวงกลองจุลทรรศน์เสมอ ก่อนทำ platelet estimation

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อหาค่า platelet estimation factor สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา

2.2 เพื่อทวนสอบ (verification) วงกลองจุลทรรศน์ที่ใช้ในการทำให้ platelet estimation กับค่า platelet count จากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

2.3 เพื่อแก้ปัญหาการนับเกล็ดเลือดผิดพลาดทั้งจำนวนเกล็ดเลือดสูงปลอมและต่ำปลอม

3. วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษา โดยการทดลอง (Experimental Research) แบบการวิจัยเชิงปฏิบัติการ (Action Research)

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรได้แก่ คือ ผู้ป่วยทั่วไปที่มารับบริการที่โรงพยาบาลสกลนคร ระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2566 ถึงวันที่ 31 มกราคม 2566

กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ ผู้ป่วยทั่วไปที่มารับบริการที่โรงพยาบาลสกลนคร ระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2566 ถึงวันที่ 31 มกราคม 2566 จำนวน 100 ราย

3.2 วัสดุและวิธีการ

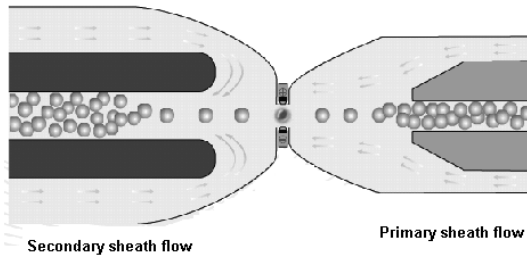
ค่า platelet count ที่ได้จากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ Sysmex XN 3000 โดยมีหลักการ hydrodynamic Focusing Direct Current Method (โรงพยาบาลสกลนคร, 2566) ดังนี้

เมื่อตัวอย่างเลือดผ่านเข็มเจาะเลือดส่วนหนึ่งจะถูกเลือดที่ส่งเข้ามาที่ช่องนี้และถูกผสมด้วยน้ำยา Cellpack DCL เพื่อเจือจางเลือดและคงรักษาสภาพเซลล์เม็ดเลือดแดงกับเกร็ดเลือดให้มีรูปร่างใกล้เคียงกับเมื่ออยู่ในกระแสเลือดหรือเรียกว่า “Near Native State” นั่นเอง เมื่อเลือดที่ถูกเจือจางแล้วนี้ (diluted blood) จะถูกส่งไปยังช่องนับเม็ดเลือดแดงและเกร็ดเลือดที่เรียกว่า RBC/PLT Detection Chamber or Channel นั้น ในช่องนับนี้มีการออกแบบพิเศษเพื่อให้เซลล์ไหลเรียงเดี่ยวผ่านที่ละเซลล์ โดยมีการฉีดน้ำยาทั้งสองด้านด้วยแรงดันและน้ำยาที่ต่างกันจากภายในช่องนับทั้งด้านหน้าก่อนการวัดและด้านหลังการวัด ทำให้การวัดถูกต้องแม่นยำขึ้น เราเรียกการออกแบบพิเศษของช่องนับนี้ว่า Hydrodynamic Focusing Direct Current method เมื่อน้ำยาไหลผ่านช่อง Aperture ที่ด้านในนี้ทำให้กระแสไฟฟ้าไหลครบวงจร แต่เมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเกร็ดเลือดซึ่งแขวนลอยอยู่ในน้ำยาไหลผ่านช่องตรวจนับ Aperture ทำให้ขัดขวางกระแสไฟฟ้าหรือเกิดความต้านทานขึ้น เพราะเซลล์มีคุณสมบัติเป็นสื่อไฟฟ้าที่ไม่ดีขึ้นนั่นเอง จากกฎของโอห์ม $V=IR$ หมายความว่าความต้านทานแปรผันโดยตรงกับขนาดของเซลล์ ดังนั้นเซลล์ขนาดใหญ่จะทำให้เกิดความต้านทานมากกว่าเซลล์ขนาดเล็ก ด้วยกฎของโอห์มทำให้เครื่องสามารถจำแนกเกร็ดเลือดและเม็ดเลือดแดงตามความแตกต่างของขนาดเซลล์ได้ เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาเรียบเรียงใหม่โดยแกนตั้งคือความถี่หรือจำนวนและแกนนอนคือ



ปริมาณเซลล์ จะได้กราฟ Histogram แสดงค่าการกระจายตัวของเม็ดเลือดแดงและเกร็ดเลือด จากกราฟนี้สามารถหาค่า RDW, RDW-SD, RDW-CV, MCV, PLT, PDW, MPV, P-LCR, PCT ตามลำดับ

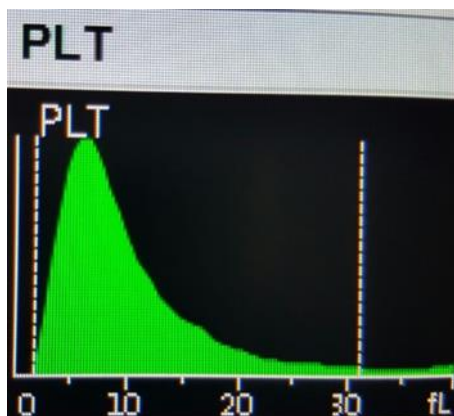
ภาพหลักการ platelet count และกราฟ จากเครื่อง Sysmex XN 3000



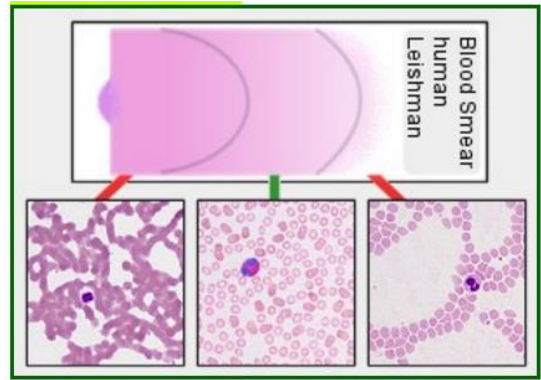
ภาพประกอบที่ 1 แสดงการนับเกล็ดเลือดโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (โรงพยาบาลสกลนคร, 2566)

TEST	RESULT	UNIT
TOTAL WBC	10	$10^9/dl$
TOTAL RBC	3.92	$10^{12}/dl$
HEMOGLOBIN	10	g/dl
PLATELETS	20,000	$10^9/dl$
M.C.V	67	fL
M.C.H	25	Pg.
MCHC	26	g/dl
R.D.W.	17.4	%

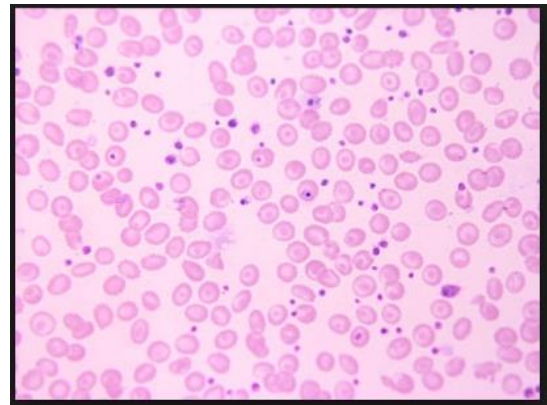
ภาพประกอบที่ 2 แสดงค่าของเกล็ดเลือดและค่าอื่น ๆ จากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (โรงพยาบาลสกลนคร, 2566)



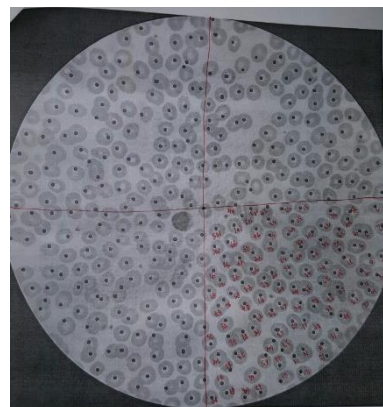
ภาพประกอบที่ 3 แสดงกราฟของขนาดเกล็ดเลือดที่มีขนาดปกติจากเครื่องตรวจอัตโนมัติ



ภาพประกอบที่ 4 แสดงพื้นที่ในการดูกล้องเพื่อทำ Platelet estimation (รูปกลางคือพื้นที่ที่เหมาะสม) (โรงพยาบาลสกลนคร, 2566)



ภาพประกอบที่ 5 ภาพเกล็ดเลือดจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X



ภาพประกอบที่ 6 แสดงวงกล้องที่เหมาะสมในการทำ Platelet estimation โดยการเทียบจำนวนเม็ดเลือดแดง



3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูลการวิจัย

1. รวบรวมผลการตรวจ platelet count จากผู้ป่วยที่มาใช้บริการตรวจความสมบูรณ์ของเลือด complete blood count CBC ที่โรงพยาบาลสกลนคร จำนวน 100 ราย โดยคัดเลือกจากกราฟจากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยกราฟเกล็ดเลือดจะเป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นว่าเกล็ดเลือดมีขนาดปกติหรือมีการเกาะกลุ่ม clumping หรือไม่ ในการศึกษานี้เลือกผลการตรวจที่ไม่มีเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

2. นำตัวอย่างเลือด EDTA ไปทำการ mix เพื่อให้เลือดและสารกันเลือดแข็งเข้ากันดีเป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง mixer จากนั้นนำเข้าเครื่องเอนโด blood smear อัตโนมัติ SP-10

3. นำ blood smear ที่ได้มาทำการ platelet estimation ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งในการศึกษานี้ใช้กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ Olympus CX31 field number (Fn) 22

4. นำค่า platelet estimation เทียบค่ากับ platelet count ที่ได้จากเครื่องอัตโนมัติ คำนวณทางสถิติ

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลการวิจัย

เปรียบเทียบค่า platelet estimation กับ platelet count ที่ได้จากเครื่องอัตโนมัติ คำนวณทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์หาความสัมพันธ์และค่า difference จาก scatter plot ระหว่าง platelet estimation และ platelet count

4. สรุปผลการวิจัย

ตารางที่ 1 จำนวนเกล็ดเลือดที่นับด้วยเครื่องอัตโนมัติ

	N	Rang	Minimum	Maximum	Sum	Mean	Std. Deviation	Variance
Automate	100	466.00	115.00	581.00	29185.00	291.85	90.03	8105.58
Valid N (listwise)	100							

ตารางที่ 1 พบว่าค่าเกล็ดเลือดจากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ minimum คือ $115 \times 10^3 / \mu\text{L}$ และ

maximum คือ $581.00 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ค่า mean คือ 291.85 และค่า standard deviation คือ 90.031

ตารางที่ 2 จำนวนเกล็ดเลือดที่นับด้วยเครื่องอัตโนมัติ

	N	Rang	Minimum	Maximum	Sum	Mean	Std. Deviation	Variance
Estimate	100	504.00	120.00	624.00	29520.00	295.20	93.48	8738.91
Valid N (listwise)	100							

จากตารางที่ 2 พบว่า จำนวนเกล็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ minimum คือ $120 \times 10^3 / \mu\text{L}$ และ maximum คือ $624 \times 10^3 / \mu\text{L}$ mean คือ 295.20 และ standard deviation คือ 9

Platelet estimation factor

$$= \frac{\text{Total ratio of platelet count}}{\text{Number of samples}}$$

$$= \frac{1189.68}{100}$$

$$= 11.89 \text{ หรือ } 12$$

ตารางที่ 3 จำนวนเกล็ดเลือดที่นับด้วยเครื่องอัตโนมัติ

Sample size	Total ratio of platelet count
100	1189.68

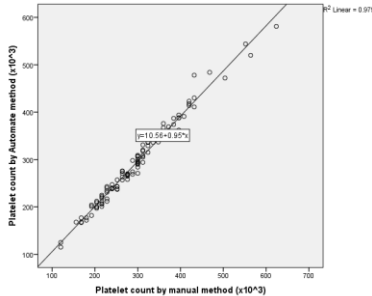
Table 3 platelet estimation factor for FN 22

***จากการคำนวณหา platelet estimation factor จากกล้องจุลทรรศน์ field number 22 ค่าที่ได้คือ 12 ซึ่งหมายถึง 1



platelet ที่พบในวงกลอง 100x มีค่า = $1 \times 12 \times 10^3/\mu\text{L}$ หรือ 12,000

กราฟที่ 1 regression analysis ระหว่าง platelet count ที่ได้จากเครื่องอัตโนมัติและจาก platelet estimation



จากกราฟที่ 1 พบว่า regression analysis ระหว่าง platelet count ที่ได้จากเครื่องอัตโนมัติและจาก platelet estimation ทำให้ทราบว่าการนับเกล็ดเลือดด้วยสองวิธีมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยค่า correlation

ตารางที่ 4 correlation ค่าเกล็ดเลือดระหว่างเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติและ platelet estimation

Correlations

		Automate	Estimate
Automate	Pearson Correlation	1	.989**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	100	100
Estimate	Pearson Correlation	.989**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	100	100

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

จากตารางที่ 4 พบว่า correlation ค่าเกล็ดเลือดระหว่างเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติและ platelet estimation ทำให้ทราบว่ามีความสัมพันธ์กันสูง คือ ICC = 1.000 และ 0.989 ตามลำดับ (ICC>0.75) *(intra-class Correlation Coefficient : ICC

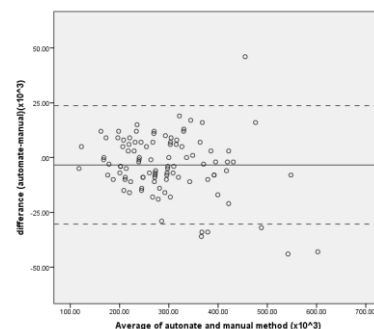
ตารางที่ 5 pair samples test ค่าเกล็ดเลือดระหว่างเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติและ platelet estimation

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Automate - Estimate	-3.350	13.791	1.379	-6.086	-.614	-2.429	99	.017

จากตารางที่ 5 พบว่า pair samples test ค่าเกล็ดเลือดระหว่างเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติและ platelet estimation พบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.017$ ($p < 0.05$)

กราฟที่ 2 แสดงการ plot ค่า difference ระหว่างค่าเกล็ดเลือดจากเครื่องอัตโนมัติและ platelet estimation จากกล้องจุลทรรศน์



ตารางที่ 6 แสดงค่าทางสถิติต่าง ๆ ที่ได้จาก SPSS

		Statistic	Std. Error	
differance	Mean	-3.3500	1.37909	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-6.0864	
		Upper Bound	-.6136	
	5% Trimmed Mean	-2.8667		
	Median	-3.5000		
	Variance	190.189		
	Std. Deviation	13.79092		
	Minimum	-44.00		
	Maximum	46.00		
	Range	90.00		
	Interquartile Range	16.50		
	Skewness	-.330	.241	
	Kurtosis	1.962	.478	

เมื่อนำค่า difference มา plot ค่า difference ระหว่างการหาค่าเกล็ดเลือดด้วยเครื่องอัตโนมัติและ platelet estimation พบว่า difference mean คือ -3.350 standard deviation SD = 13.790 93% อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (mean±2SD) และ 91% จากการนับเกล็ดเลือดทั้งสองวิธี ค่าแตกต่างกันน้อยกว่า 20,000 platelets/uL

5. อภิปรายผล

การนับเกล็ดเลือดด้วยเครื่องอัตโนมัติยังมีข้อจำกัดและยังถูกรบกวนด้วยตัวอนุภาคอื่นที่มีขนาดเล็กและใกล้เคียงกับเกล็ดเลือด เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดงขนาดเล็ก เซลล์เม็ดเลือดขาวที่แตกสลาย หรือแม้แต่การเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดเองก็ทำให้การนับผิดพลาดไปได้ การติดตามด้วยการดู blood smear ด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงยังคงมีความสำคัญที่จะช่วยยืนยันค่าที่ได้จากเครื่องตรวจอัตโนมัติ นั่นคือการทำ platelet estimation โดยการนับ 10 immersion fields ในพื้นที่ที่เหมาะสม (good area) จากนั้นนำค่าเฉลี่ยมาคูณด้วย factor ซึ่งจะทำให้ได้ค่า platelet count ออกมา

7. เอกสารอ้างอิง

โรงพยาบาลสกลนคร. (2566). การตรวจวิเคราะห์สาขาโลหิตวิทยาด้วยเครื่อง XN-3000. SKN-WI-LAB3-001.

Hae Lyun Ahn. (2002). EDTA-dependent Pseudothrombocytopenia Confirmed by Supplementation of Kanamycin; A Case Report. (PMC PubMed). Korean J Intern Med.

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ค่า platelet estimation factor คือ 12 ซึ่งค่า factor ที่ได้เป็นตัวแทนของ 1 platelet เช่น หากพบว่าใน 1 วงกล้องมีเกล็ดเลือด 10 ค่า platelet count = $10 \times 12 \times 10^3/\mu\text{L}$ หรือ 120,000 นั่นเอง

ค่า ICC ที่คำนวณได้จะเป็นสิ่งที่บอกถึงความน่าเชื่อถือและความถูกต้องจากการคำนวณ ซึ่งจากการวิจัยนี้ได้ค่า $r = 0.989$, $p = 0.017$, $\text{ICC} = 0.989$ ($\text{ICC} > 0.750$) ในส่วนของความแตกต่างระหว่าง 2 วิธี เราพบว่าค่า difference mean คือ -3.350 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และ 93% อยู่ในช่วง mean±2SD

6. ข้อเสนอแนะ

การทำ platelet estimation ยังคงมีข้อจำกัดและความผิดพลาดได้สูง พบได้ในกรณีที่เกล็ดเลือดมีปริมาณมาก เนื่องจากผู้ปฏิบัติมีความแตกต่างกันในการเลือกบริเวณพื้นที่ที่เหมาะสม (good area) ที่แตกต่างกัน ตลอดจนปริมาณงานประจำวันที่มีจำนวนมากขึ้น อาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการทำได้ เกล็ดเลือดที่มีการเกาะกลุ่ม (platelet with clumping) มีผลทำให้การหาค่าเฉลี่ยผิดพลาดได้เช่นกัน