



รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

การเปรียบเทียบการนับเกล็ดเลือดในสุนัขและแมวด้วยวิธี Automated Hematology Analyzer กับ Manual method โดย Thin blood smear และ Hemocytometer counting chamber

Measurement of Platelet Count in the Canine and Feline By Automated Hematology Analyzer, Manual method by Thin blood smear and Hemocytometer counting chamber

โดย

นางสาว กรรณิกา คงทะเล รหัสนักศึกษา 6240213101

นางสาว ไศภิสรา เมาเสมอ รหัสนักศึกษา 6240213110

สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ ผู้จัดทำมีความสนใจเพื่อประเมินประสิทธิภาพการนับจำนวนเกล็ดเลือดสุนัขและแมว โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer การประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) ว่ามีสอดคล้องกันหรือไม่ เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการรายงานผลตรวจที่มีประสิทธิภาพต่อไป

ในการดำเนินโครงการวิจัยได้รับความร่วมมือและให้คำปรึกษาเป็นอย่างดีจาก อาจารย์สุดจิตต์ จุงพิวัฒน์ สพ.ญ.ปิยะภรณ์ คำดี ผศ.น.สพ.ดร.วชิรา หุ่นประสิทธิ์ และขอขอบคุณ Vet Central Lab ศูนย์ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ที่อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ที่ใช้ในการทำงานวิจัย รวมไปถึงทุกท่านของ Vet Central Lab ที่ให้คำแนะนำในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้

ท้ายสุดนี้ ผู้จัดทำหวังว่าโครงการวิจัยฉบับนี้คงมีประโยชน์บ้างไม่มากก็น้อยสำหรับผู้สนใจเกี่ยวกับการประเมินประสิทธิภาพการนับจำนวนเกล็ดเลือดสุนัขและแมว โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer การประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer)

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: การศึกษาครั้งนี้คือเพื่อเปรียบเทียบการนับเกล็ดเลือดด้วยวิธีการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) การนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) ว่าวิธีไหนมีความน่าเชื่อถือที่สุดหรือใช้ 2 ใน 3 ในการวินิจฉัยผลที่ดีที่สุด

วิธีการดำเนินการวิจัย: การตรวจนับเกล็ดเลือดในสุนัขจำนวน 50 ตัวอย่าง และแมว 50 ตัวอย่างที่ส่งมาตรวจเลือดที่ Vet Central Lab (ศูนย์ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์) โดยบรรจุเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA

ผลการวิจัย: การนับเกล็ดเลือดในสุนัขและแมวโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) มีความสอดคล้องกันสูงสุดโดยค่า Pearson's $r = 0.911$ ($p\text{-value} < 0.01$) และค่า ICC = 0.900 ($p\text{-value} < 0.001$) และ Pearson's $r = 0.787$ ($p\text{-value} < 0.001$) ,ค่า ICC = 0.785 ($p\text{-value} < 0.001$) ตามลำดับ

ผลสรุป: แม้ว่าเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติจะให้ค่าสอดคล้องกับวิธีการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือดแต่จะพบว่ามี bias โดยเฉลี่ยที่ประมาณ 64,000 platelet, 167,223 platelet และแมวโน้มจะมีปัญหาดังนั้นจึงควรต้องมีการนับเกล็ดเลือดควบคู่ด้วย

คำสำคัญ: เกล็ดเลือด สเมียร์เลือด เครื่องวิเคราะห์เลือดอัตโนมัติ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อ	
สารบัญ	
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
1.4 สมมุติฐานการวิจัย	1
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	2
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แนวคิดทฤษฎี	4
2.1.1 ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia)	4
2.1.2 การประเมินเกล็ดเลือด	4
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	16
3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดสุnichและแมว	16
3.2 การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ	16
3.2.1 เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Automated hematology analyzer	16
3.2.2 การนับแบบประมาณการ (Estimate platelet number) Thin Blood smear	16
3.2.3 การนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer)	17
3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	19
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	20
4.1 การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis) ของจำนวนเกล็ดเลือดในสุnich	20
4.1.1 ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้อง (agreement test) ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear	20
4.1.2 ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้อง (agreement test) ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber และ thin blood smear	25

4.2 การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis)	27
ของจำนวนเกล็ดเลือดในแมว	
4.2.1 ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้อง (agreement test)	27
ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine	
และ thin blood smear	
4.1.2 ผลการเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement test)	27
ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber	
และ thin blood smear	
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	32
5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล	32
5.1.1 การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis) ของ	32
จำนวนเกล็ดเลือดในสุนัข	
5.1.2 การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis) ของ	33
จำนวนเกล็ดเลือดในแมว	
บรรณานุกรม	36

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (Thrombocytopenia) เป็นภาวะการแข็งตัวของเลือดผิดปกติที่พบได้บ่อยที่สุดในสัตว์เลี้ยง การประเมินจำนวนเกล็ดเลือดจึงเป็นการทดสอบขั้นแรก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อไม่มีประวัติบ่งชี้ถึงสาเหตุเฉพาะของการที่เลือดไหลไม่หยุด (hemorrhage) หรือเมื่อเลือดออกมีลักษณะเป็นจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง (petechial) หรือมาจากเยื่อเมือก (mucosal surfaces) ในสัตว์ที่โตเต็มวัย ดังนั้นการประเมินจำนวนเกล็ดเลือดที่แม่นยำจึงมีความสำคัญต่อการวางแผนในการวินิจฉัยและการรักษาโรคเป็นอย่างมาก (Parry, 1989)

การนับเกล็ดเลือดในปัจจุบันมีหลายวิธีโดยวิธีดั้งเดิมที่ใช้การนับแบบประมาณการ (Estimate platelet number) การนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (Platelet count using hemocytometer) และการนับด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Automated hematology analyzer) โดยวิธีที่นิยมคือ การนับด้วย เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (automated hematology analyzer) เนื่องจากมีความก้าวหน้าของเทคโนโลยีที่ทำให้ลดขั้นตอนต่างๆ ลง เช่น การเจือจางเลือด การนับจำนวนเม็ดเลือด การเตรียมแผ่นสไลด์และการย้อมสี เป็นต้น จึงทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว (พรธณี, 2009) อย่างไรก็ตามจะพบปัญหาเมื่อใช้เครื่องตรวจเลือดอัตโนมัติแบบแมนวูเอลซึ่งมักพบว่ามีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) เนื่องจากตัวนับอิมพีแดนซ์แยกความแตกต่างของ เซลล์ตามขนาดเพียงอย่างเดียว ทำให้เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือดของแมวมีขนาดทับซ้อนกัน ดังนั้นการตั้งค่าที่แยกเม็ดเลือดแดงออกจากจำนวนเกล็ดเลือดก็จะไม่รวมสัดส่วนของเกล็ดเลือดด้วย อีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาคือ การรวมตัวกันของเกล็ดเลือดในหลอดเก็บเลือด ซึ่งเกิดขึ้นได้ง่ายและมักพบในเลือดแมว (Zelmanovic et.al, 1998) เปรียบกับการนับแบบ manual method ทั้ง 2 วิธี คือการนับแบบประมาณการ (Estimate platelet number) โดยการดูสเมียร์เลือดเพื่อดูลักษณะการติดสีและขนาดของเกล็ดเลือดเพื่อยืนยันภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (ชาอุชัย, 2558) และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) ซึ่งการนับเกล็ดเลือดโดยวิธีนี้มีความแม่นยำน้อยกว่าการนับด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติเนื่องจากไม่สามารถแยกเกล็ดเลือดออกจากเศษเซลล์ได้ และการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดก็จะลดจำนวนเกล็ดเลือดที่แท้จริงลง (“Platelet number”, n.d.) โดยข้อจำกัดของการนับแบบ manual method ต้องใช้เวลานานในการดำเนินการ

แม้จะมีการใช้เทคโนโลยีอัตโนมัติ (automated hematology analyzer) อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการแต่การนับโดย manual counting ก็ยังเป็นที่ยอมรับในห้องปฏิบัติการที่ทรัพยากรไม่เพียงพอนอกจากนี้บางครั้งอาจจำเป็นต้องใช้วิธีการ manual counting หากจำนวนเกล็ดเลือดต่ำหรือมีเกล็ดเลือดผิดปกติอยู่ในตัวอย่าง (England JM, 1998 และ Rowan RM, 1991)

ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่ค่อยพบงานวิจัยที่เกี่ยวกับวิธีการนับเกล็ดเลือดในแมวและสุนัข ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้คือเพื่อเปรียบเทียบการนับเกล็ดเลือดด้วยวิธีการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) การนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการรายงานผลตรวจที่มีประสิทธิภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 การศึกษาครั้งนี้คือเพื่อเปรียบเทียบการนับเกล็ดเลือดด้วยวิธีการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) การนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการรายงานผลตรวจที่มีประสิทธิภาพต่อไป

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 การศึกษาเปรียบเทียบการนับเกล็ดเลือดทั้ง 3 วิธี คือการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) การนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการรายงานผลตรวจที่มีประสิทธิภาพต่อไป

1.3.2 เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดทางห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพ

1.4 สมมุติฐานการวิจัย

1.4.1 การนับเกล็ดเลือดด้วยวิธีการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) การนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) มีความสัมพันธ์กัน

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 เพื่อเปรียบเทียบค่าความสัมพันธ์เกล็ดเลือดของสุนัขและแมว

1.5.2 ตัวอย่างเลือดที่ใช้ทดสอบคือ เลือดสุนัขและแมวชนิดละ 50 ตัวอย่าง ที่บรรจุในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA จาก Vet Central Lab ศูนย์ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์

1.5.3 ทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

1.5.3.1 เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (automated hematology analyzer)

1.5.3.2 การนับแบบประมาณการ (estimate platelet number) จาก thin blood smear

1.5.3.3 การนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer)

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดทฤษฎี

2.1.1 ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (Thrombocytopenia)

ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (Thrombocytopenia) เป็นภาวะการแข็งตัวของเลือดผิดปกติที่พบได้บ่อยที่สุดในสัตว์เลี้ยง การประเมินจำนวนเกล็ดเลือดจึงเป็นการทดสอบขั้นแรก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อไม่มีประวัติบ่งชี้ถึงสาเหตุเฉพาะของการที่ เลือดไหลไม่หยุด (hemorrhage) หรือเมื่อเลือดออกมีลักษณะเป็นจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง (petechial) หรือมาจากเยื่อเมือก (mucosal surfaces) ในสัตว์ที่โตเต็มวัย (Parry, 1989)

2.1.1.1 สาเหตุของภาวะเกล็ดเลือดต่ำ

1. เกล็ดเลือดต่ำจากการสร้างที่ไม่เพียงพอ (inadequate platelet production) การสร้างเกล็ดเลือดที่ไม่เหมาะสมมักเกิดจากความผิดปกติที่ไขกระดูกโดยตรง (primary bone marrow disorder) หรือที่เรียกว่า myelophthisis เป็นความผิดปกติที่เกิดจากมีเซลล์เนื้องอกหรือเซลล์อักเสบเข้ามาแทนที่เซลล์เม็ดเลือดในไขกระดูก และจากการใช้ยาบางชนิด เช่น เคมีบำบัด (cytotoxic agents) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจน เพราะมีผลลดการทำงานของไขกระดูก โดยทั่วไป ถ้ามีความผิดปกติที่ไขกระดูก มักจะไม่พบว่าเกล็ดเลือดต่ำลงอย่างเดียวยาวจะพบว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ ก็ลดลงด้วย เม็ดเลือดและหรือเม็ดเลือดขาวต่ำได้เช่นกัน

2. เกล็ดเลือดต่ำจากการทำลายเกล็ดเลือดมากเกินไป (excessive destruction) สาเหตุที่มักพบได้แก่ immune mediated thrombocytopenie (ITP) การวินิจฉัยครั้งสุดท้ายว่าสัตว์ป่วยเป็น ITP นั้นค่อนข้างทำได้ยากจำเป็นต้องทำการตรวจ platelet factor III การวัดปริมาณ anti-platelet antibody

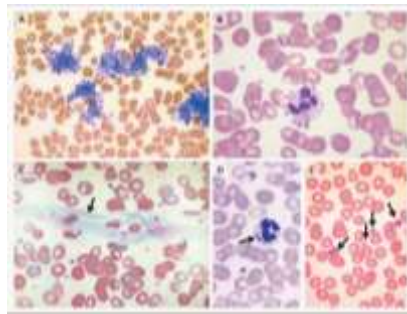
3. เกล็ดเลือดต่ำจากการใช้มากเกินไป (excessive consumption) การใช้เกล็ดเลือดมากเกินไปมักจะเจอในรายที่เกิด DIC (disseminated intravascular coagulation) คือการมีการสร้างลิ่มเลือดคู่กับการสลายเม็ดเลือดขึ้นทำให้เกิดเลือดออกตามมา สาเหตุที่ทำให้เกิด DIC เช่น Neoplasia (โดยเฉพาะ Splenic haemangiosarcoma), Bacterial sepsis, Pancreatitis, Heat stroke, shock, Snake bite, Autoimmune hemolytic anemia, Gestic dilatation and torsion (Vpat new, 2554)

2.1.2 การประเมินเกล็ดเลือด

เกล็ดเลือดสำคัญอย่างมากในสุนัขและแมวซึ่งการนับจำนวนเกล็ดเลือดสามารถประเมินสุขภาพและวินิจฉัยโรคของสัตว์เบื้องต้นได้ โดยปกติจำนวนเกล็ดเลือดสุนัขและแมวใกล้เคียงหรือ $\geq 200,000 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (Thrombocytopenia) จะมีจำนวนเกล็ดเลือด $< 30,000 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ หรือในสัตว์บางตัวจำนวนเกล็ดเลือดต่ำ $< 10,000 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ("Platelet number", n.d.) การนับจำนวนเกล็ดเลือดมีหลายวิธี

2.1.2.1 การนับแบบประมาณการ (estimate platelet number) จาก Thin Blood smear

การประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือดยังคงเป็นเครื่องมือวินิจฉัยที่สำคัญ เนื่องจากการดูแผ่นสเมียร์เลือดเป็นการตรวจสอบความถูกต้องและสามารถอธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับลักษณะของเม็ดเลือดและเกล็ดเลือด เช่น ความผิดปกติที่เกิดขึ้นภายในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ลักษณะการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (platelet clumping) เกล็ดเลือดที่มีลักษณะใหญ่กว่าปกติ (Giant platelet) ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการวินิจฉัยโรคของสัตว์แพทย์ (Bain, 2005)

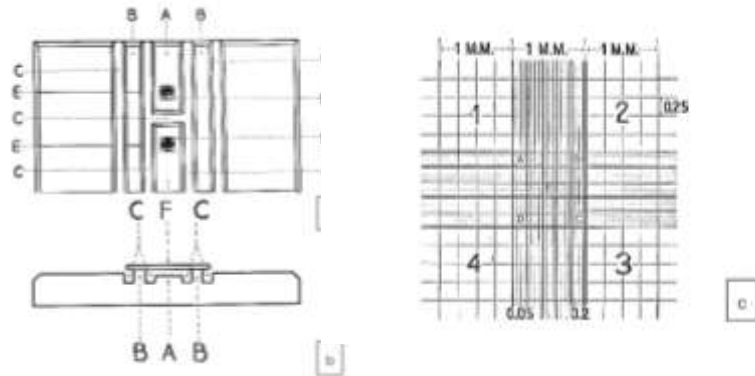


รูปที่ 2.1 ลักษณะของฟิล์มสเมียร์เลือดที่เกี่ยวข้องกับภาวะเกล็ดเลือดต่ำและการนับเกล็ดเลือด
ที่มา: Bain, 2005

2.1.2.2 การนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer)

นำเลือดที่บรรจุในหลอด EDTA เจือจางในแอมโมเนียมอีทอกซาลेट 1 % ในอัตราส่วน 1:100 ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แอมโมเนียมอีทอกซาลेटจะสลายเม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นหยดเลือดที่เจือจางลงบน chamber แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในที่ที่มีความชื้น (England et.al, 1998, Brecher et.al, 1953 and Rowan, 1991) อย่างไรก็ตามข้อเสียของการนับเกล็ดเลือดด้วยเทคนิคนี้คืออาจเกิดข้อผิดพลาดในขั้นตอนการเจือจางเลือด และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ยังหลงเหลืออยู่อาจถูกเข้าใจผิดว่าเป็นเกล็ดเลือด (Harrison et.al, 2000)

หลักการ แบ่งเป็น 2 chamber ตารางบนแต่ละ chamber มีความกว้าง 3 มม. ยาว 3 มม. ในแต่ละ chamber แบ่งเป็น 9 ช่อง แต่ละช่องมีความกว้างและยาว 1 มม. และเมื่อปิด cover-chamber แล้ว จะมีความลึก 0.1 มม. ดังนั้น แต่ละช่องจะมีปริมาตร $1 \times 1 \times 0.1 = 0.1$ ลบ.มม. ที่ขอบของตารางจะเห็น มีเส้นอยู่ 3 เส้นให้ คือเส้นกลางเป็นเส้นขอบและในแต่ละช่องที่มุมทั้งสี่ แบ่งออกเป็นเส้นเล็กๆอีก 16 ช่อง ซึ่งใช้ในการนับเม็ดเลือดขาว ส่วนช่องตรงกลางแบ่งเป็น 25 ช่องเล็กและจะใช้ช่องเล็กนี้เพียง 5 ช่องคือช่องเล็กที่มุมทั้งสี่ และตรงกลางสำหรับนับเม็ดเลือดแดงซึ่งในแต่ละช่องเล็กใน 25 ช่องนี้จะแบ่งเล็กออกไปอีกเป็น 16 ช่อง การนับเกล็ดเลือดนับในบริเวณช่องเม็ดเลือดแดง (ควรนับอย่างน้อย 10 ช่อง) แนะนำนับ 25 ช่อง (วิน เขยชมศร 2559)



รูปที่ 2.2 Hemocytometer (Counting chamber) และสเกลใน Hemocytometer

ที่มา: วิน เขยชมศร 2559

แม้จะมีการใช้เทคโนโลยีอัตโนมัติ (automated hematology analyzer) อย่างแพร่หลาย แต่การนับเกล็ดเลือดด้วยตนเองยังคงใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการที่ขาดแคลนทรัพยากร และภายในห้องปฏิบัติการวิจัยที่ไม่สามารถเข้าถึงเครื่องมือเฉพาะทางได้ นอกจากนี้บางครั้งอาจจำเป็นต้องใช้วิธีการนับจำนวนด้วยมือในห้องปฏิบัติการทางคลินิก หากจำนวนเกล็ดเลือดต่ำหรือมีเกล็ดเลือดผิดปกติอยู่ในตัวอย่าง (Harrison et.al, 2000 and England et.al, 1998)

2.1.2.3 เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (automated hematology analyzer)

การนับเกล็ดเลือดด้วยตนเองเป็น "gold standard" ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาอย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลามาก และการนับด้วยมืออาจเกิดความไม่แม่นยำได้สูงและความแปรปรวนระหว่างผู้สังเกตการณ์สูง (Jung et.al, 2010) เครื่องวิเคราะห์และแยกชนิดของเม็ดเลือดในปัจจุบันจะใช้เทคโนโลยีหลายอย่างร่วมกัน ได้แก่ การใช้คอมพิวเตอร์มาช่วยในการวิเคราะห์และคำนวณผลการใช้แสงเลเซอร์และคลื่นวิทยุมาช่วยในการตรวจวิเคราะห์ เป็นต้น สำหรับคุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัตินั้นจะอาศัยคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ คุณสมบัติทางด้านเคมีของเซลล์ (cyto-chemistry) การกระจายแสงของเซลล์ (cell light scatter) และการเป็นสื่อนำไฟฟ้าของเซลล์ (cell conductivity) โดยใช้อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ร่วมกัน ทำให้ได้ข้อมูลจากการวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดได้มากขึ้นพารามิเตอร์เหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในส่วนของ การวินิจฉัยแยกชนิดของโรค การติดตามผลการรักษาตลอดจนการวิจัย หลักการของเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Principles of automated hematology analyzer) เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติมีการนำหลักการหลายอย่างมาใช้ร่วมกันเพื่อให้สามารถทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้หลากหลาย มีความแม่นยำ ถูกต้องและรวดเร็ว ปัจจุบันหลักการต่างๆ ที่นำมาใช้ในเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ ได้แก่

1. Hydrodynamic Focusing หลักการนี้คือ เมื่อเลือดถูกเจือจางด้วยน้ำยาแล้วถูกส่งไปยังช่องนับเม็ดเลือด ขณะที่เซลล์ผ่านไปยัง aperture เซลล์เม็ดเลือดจะถูกบังคับให้ไหลเรียงเดี่ยวด้วยการใช้น้ำยาที่มีความเข้มข้นและแรงดันที่แตกต่างกัน หรือที่เรียกว่า front sheath ดังนั้นเซลล์แต่ละ

ตัวจะถูกนับที่ละเซลล์และเมื่อเซลล์ถูกนับและผ่าน aperture ไปแล้วเซลล์ที่ถูกนับแล้วจะถูกบังคับให้ไหลเรียงตัวออกไปด้วยการใช้น้ำยาที่มีความเข้มข้นและแรงดันที่แตกต่างกันเรียกว่า back sheath ด้วยหลักการนี้ทำให้การวิเคราะห์เม็ดเลือดถูกต้องและแม่นยำเนื่องจากแต่ละเซลล์จะถูกนับเพียงครั้งเดียวเท่านั้นไม่มีเซลล์ใดถูกนับซ้ำ เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติส่วนใหญ่จะนำหลักการนี้มาใช้ร่วมกับหลักการอื่น

2. Impedance Cell Counting and Sizing การวัดการเปลี่ยนแปลงของการต้านกระแสไฟฟ้าของเม็ดเลือด (electrical resistance) เมื่อไหลผ่าน aperture ที่มีไฟฟ้ากระแสตรง (direct current) ไหลผ่าน สามารถบอกจำนวนเซลล์ที่นับได้ และขณะเดียวกันก็สามารถบอกขนาดหรือปริมาตรของเซลล์ได้ โดยอาศัยหลักการว่าอัตราการลดของกระแสไฟฟ้าที่เซลล์เข้าไปขัดขวางทางผ่านจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรของเซลล์

3. Light - Scatter หลักการนี้อาศัยคุณสมบัติของเซลล์เม็ดเลือดที่มีดัชนีการหักเหแสง (refractive index) แตกต่างกัน เมื่อฉายลำแสง (lightbeam) ไตแก laser ที่ปรับให้เล็กลงและโฟกัสไปที่เซลล์ เซลล์จะหักเหแสงให้กระจาย (scattered) ออกไป และโดยการบันทึกปริมาณของ light scatter ที่มุมต่างองศาโดยการบันทึกที่มุมต่ำ (low angle) จะได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับขนาดของเซลล์ ส่วนการบันทึกที่มุมสูง (high angle) จะได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของสารที่อยู่ภายในเซลล์ นั้น ตลอดจน structural complexity ที่อยู่ในเซลล์ ไตแก granules และ nuclear shape เป็นต้น

4. Light Absorption หลักการนี้อาศัยการย้อมเซลล์โดยปฏิกิริยาเคมีต่อเซลล์ (cytochemistry) โดยจะย้อมส่วนแกรนูลของเม็ดเลือดขาวในการติดสี peroxidase เพื่อใช้ในการแยกชนิดต่างๆ ของเม็ดเลือดขาวให้ครบ 5 ชนิด และนอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบ hemoglobin concentration

5. Electrical Conductivity ใช้วัดความเป็นสื่อ นำกระแสไฟฟ้าของเซลล์เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าที่มีความถี่สูงโดยใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic wave) ชนิดที่มีความถี่สูงในการตรวจสอบคุณสมบัติการนำกระแสไฟฟ้าของเซลล์ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีแต่ผ่านสิ่งต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น แกรนูล นิวเคลียส และสารองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ได้ไม่ดี เทคโนโลยีนี้จึงเหมาะสำหรับใช้เพื่อแยกชนิดของ granulocytes

6. Radio Frequency เป็นวิธีการที่ใช้คลื่นวิทยุเข้าไปตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ เพื่อช่วยในการแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว หลักการคือคลื่นวิทยุนี้สามารถจะเคลื่อนตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และ cytoplasm ได้ แต่เมื่อถึงนิวเคลียสคลื่นวิทยุจะถูกขัดขวางไว้ โดยการขัดขวางนี้จะขึ้นอยู่กับขนาดและความหนาแน่นของนิวเคลียส โดยนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่และมีความหนาแน่นสูงจะขัดขวางคลื่นวิทยุได้มากและจะสร้างสัญญาณสูง หลักการนี้จะทำให้สามารถแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใกล้เคียงกันแต่มีความแตกต่างของแกรนูล และนิวเคลียสออกจากกันได้ โดยเฉพาะการแยก granulocyte ออกจาก monocyte

7. Lights cattering และ Multi-angle polarizeds catter separation (M.A.P.S.S.) เป็นหลักการวัดการกระจายแสง laser จากเซลล์โดยมีตัวรับแบบแบ่งแยกหลายมุม วิธีการคือโดยการยิงแสง laserไปที่เซลล์ขณะไหลผ่าน flow cell แบบเรียงเดี่ยว ขณะเดียวกันเมื่อเซลล์กระจายแสง เครื่องจะมีตัวตรวจรับ (detector) ตั้งที่มุมต่างกัน โดยข้อมูลที่ได้จาก detector ทั้งหมดจะสามารถนำไปวิเคราะห์และแยกชนิดเม็ดเลือดขาวได้ทั้ง 5 ชนิด

8. Fluorescence เครื่องวิเคราะห์รุ่นใหม่จะนำ fluorescence มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของ RNA ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ reticulocytes และ “reticulated” platelets และวิเคราะห์ปริมาณของ DNA เพื่อการวิเคราะห์ nucleated red blood cells ตลอดจนวิเคราะห์ cell surface markers ได้แก่ CD4 และอื่นๆ

การประเมินค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาโดยเครื่องอัตโนมัติเครื่องอัตโนมัติจะทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ โดยการแยกวิเคราะห์เป็นส่วนๆ โดยเครื่องจะแบ่งตัวอย่างเลือดบางส่วนไปทำให้เกิดการ lysis เพื่อวัด Hb และวิเคราะห์เม็ดเลือดขาว แต่บางส่วนจะถูกนำไปเจือจางโดยไม่เกิด lysis เพื่อวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดค่าที่ได้บางค่าได้จากการวิเคราะห์โดยตรงตามหลักการที่กล่าวมาแล้วบางค่าได้จากการคำนวณจาก primary data เช่น Hct, MCH และ MCHC เป็นต้น ทำให้ได้ค่าการวิเคราะห์ประมาณ 20 ถึง 30 พารามิเตอร์ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือเพื่อทำให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าเชื่อถือ การใช้หลักการหลายอย่างร่วมกันนี้ ทำให้สามารถวิเคราะห์แยกชนิดของเม็ดเลือดขาวได้ครบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ neutrophil, eosinophil, basophil, monocyte และ lymphocyte (พรรณี, 2009)

อย่างไรก็ตามจะพบปัญหาเมื่อใช้เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติตรวจเลือดในแมวจะพบว่า มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (Jordan et.al, 1993) เนื่องจากตัวนับอิมพีแดนซ์แยกความแตกต่างของเซลล์ตามขนาดเพียงอย่างเดียวในแมวเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดมีขนาดใกล้เคียงกัน ดังนั้นการที่จะแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงออกจากเกล็ดเลือดก็จะทำได้ยาก และอีกหนึ่งปัญหาเกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือดซึ่งเกิดขึ้นได้ง่ายและมักพบในเลือดแมวการรวมตัวของเกล็ดเลือดเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่อาจทำให้พวกมันถูกนับเป็นเซลล์ขนาดใหญ่หนึ่งเซลล์โดยตัวนับเซลล์อิมพีแดนซ์ประเมินจำนวนเกล็ดเลือดต่ำเกินไปและเพิ่มจำนวนเซลล์ประเภทอื่นอย่างผิดๆ จำนวนเกล็ดเลือดที่ลดลงอย่างผิดพลาดก็เกิดขึ้นเช่นกัน (Zelmanovic et.al, 1998)

พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับเกล็ดเลือด

Mean platelet volume (MPV) คือค่าเฉลี่ยปริมาตรของเกล็ดเลือด จะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงขนาดของเกล็ดเลือด ซึ่ง MPV จะ equivalent กับ MCV โดยค่าที่เพิ่มขึ้นของ MPV จะทำให้สามารถแยกแยะระหว่าง normal และ abnormal platelet populations MPV มีหน่วยเป็น fL โดยค่าปกติของ MPV คือ 7.2-11.1 fL

Platelet distribution width (PDW) คือค่าความกว้างของการกระจายตัวของปริมาตรเกล็ดเลือด จะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความแตกต่างของขนาดของเกล็ดเลือด ซึ่ง PDW จะ equivalent กับ RDW โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของ PDW จะทำให้สามารถแยกแยะระหว่าง normal และ abnormal platelet populations เช่นเดียวกัน PDW มีหน่วยเป็นร้อยละ (%)

Plateletcrit (PCT) คือค่าปริมาตรอัดแน่นเกล็ดเลือดเป็นค่าที่ equivalent กับ HCT แต่เป็นค่าที่ยังไม่ทราบประโยชน์แน่ชัดค่าปกติอาจแตกต่างกันไปตามเทคโนโลยีที่ใช้วิเคราะห์ PCT มีหน่วยเป็นร้อยละ (%)

Plateletlarge cell ratio (P-LCR) เป็นค่าอัตราส่วนระหว่างเกล็ดเลือดที่มีขนาดเล็กกว่า 12 fL และที่มีขนาดมากกว่า 12 fL ซึ่งหากต่ำกว่าปกติใช้เตือนการเกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด สามารถนำไปใช้ติดตามสภาวะการสร้างเกล็ดเลือด (พรรณี, 2009)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Tasker et.al, 2001 ศึกษาเกี่ยวกับการประเมินเกล็ดเลือดในแมว วัตถุประสงค์ของการศึกษาคั้งนี้เพื่อหาความสัมพันธ์ของการนับเกล็ดเลือดโดยวิธีต่างๆ คือ การนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer), การนับแบบประมาณการจาก blood smear และเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติรุ่นต่างๆ คือ QBC VetAutoread analyser, Zynocyte VS/2000 analyser และ Zynostain modified counting chamber kit และยังศึกษาเกี่ยวกับสารต้านการแข็งตัวของเลือดในหลอด EDTA และ sodium citrate มีผลต่อจำนวนเกล็ดเลือดที่เข้าเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติหรือไม่

ตารางที่ 2.1 สถิติเชิงพรรณนาของการนับเกล็ดเลือดโดยวิธีต่างๆ

	n	Mean	Median	Standard deviation	Standard error of mean	Minimum value	Miximum value
Manual haemocytometer Platelet count ($\times 10^9$ /litre)	49	421.0	440.0	142.6	20.4	47.5	775.0
QBC VetAutoread analyser ($\times 10^9$ /litre)	48	333.8	341.0	117.3	16.9	41.0	599.0
VS/2000 analyser ($\times 10^9$ /litre)	48	210.6	220.5	136.4	19.7	14.0	551.0
Platelet count from blood smear ($\times 10^9$ /litre)*	41	415.2	417.5	153.8	24.0	35.0	665.0
Platelet count from Zynostain ($\times 10^9$ /litre)	46	384.3	380.8	152.7	22.5	17.9	785.4
Impedance automated Baker System count: EDTA sample ($\times 10^9$ /litre)	47	161.6	124.0	131.6	19.2	2.0	608.0
Impedance automated Baker System count: citrate sample ($\times 10^9$ /litre)	50	234.0	190.9	167.2	23.6	4.4	756.8

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการนับเกล็ดเลือดต่างๆ

	QBC VetAutoread analyser	VS/2000 analyser	blood smear estimate	Zynostain kit	Impedance automated Baker System : EDTA	Impedance automated Baker System : citrate
Haemocytometer Manual count	0.538	0.505	0.776	0.329	0.579	0.629
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.027	<0.0001	<0.0001

ทุกวิธีไม่ได้ให้ความสัมพันธ์สูง (ค่า P-value < 0.8) แต่จะเห็นว่าการประเมินเกล็ดเลือดโดยวิธี Blood smear มีความสัมพันธ์สูงสุด (P-value =0.776) การประเมินเกล็ดเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติโดยใช้เลือดจากหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Sodium Citrate (P-value = 0.629) มีค่าความสัมพันธ์สูงกว่า หลอดตัวอย่างที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA (P-value = 0.579)

ผู้เขียนแนะนำว่าควรตรวจนับเม็ดเลือดด้วย manual haemocytometer หรือ blood smear เป็นประจำ ในแนวการตรวจนับเกล็ดเลือดในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติมีความผิดพลาดหรือไม่ สอดคล้องกับผลการวินิจฉัยทางคลินิก เนื่องจากการนับเม็ดเลือดค่อนข้างยากต้องใช้ความชำนาญในการตรวจหรือประสบการณ์ทางเทคนิคในระดับหนึ่ง

จากงานวิจัยของ Malok et.al, 2007 การเปรียบเทียบวิธีการประเมินจำนวนเกล็ดเลือดสองวิธีสำหรับการตรวจสเมียร์เลือด (Peripheral Blood Smears) การศึกษาการนับเกล็ดเลือดแบบดั้งเดิม (estimation methods) ซึ่งใช้การศึกษานี้เป็นการตรวจสอบวิธีการประเมินจำนวนเกล็ดเลือดสองวิธีว่าค่าฮีโมโกลบินเป็นปกติหรือต่ำ และเครื่องวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือดอัตโนมัติว่าค่าต่ำ ปกติ หรือสูง หรือไม่

ผลการศึกษาพบว่าวิธีการแบบดั้งเดิมในการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดแบบสเมียร์เลือด (Peripheral Blood Smears) ให้การประมาณที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการนับด้วยวิธีอัตโนมัติใน Coulter LH750 โดยอิงจากการวิเคราะห์แบบ paired T-test ที่ $p < 0.05$ การประมาณจำนวนเกล็ดเลือดด้วยวิธีดั้งเดิมโดยทั่วไปจะสูงกว่าการนับอัตโนมัติเล็กน้อย แต่มีความแม่นยำเพียงพอที่จะให้การประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจาก blood smear เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพ

จากงานวิจัยของ Norman et.al, 2001 ศึกษาเกี่ยวกับความชุกของภาวะเกล็ดเลือดต่ำในแมวโดยใช้เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (automated hematology analyzer) เปรียบเทียบกับความชุกของภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากการประมาณการจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) โดยใช้หลอดเก็บเลือด EDTA พบว่าการนับเกล็ดเลือดโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ความชุกของภาวะเกล็ดเลือดต่ำในแมวเป็นสูงถึง (71%) ในขณะที่ความชุกของภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากการประมาณการ blood smear มีเพียง (3.1%) เนื่องจากในแมวนั้นเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดแดงมีขนาด

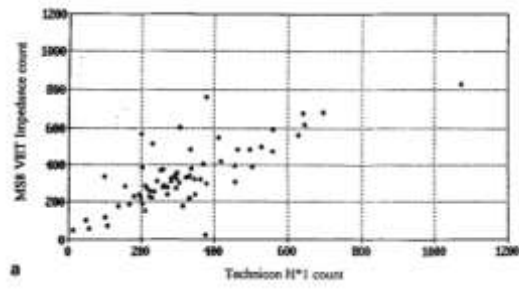
ที่ใกล้เคียงกันหรือเกิดการซ้อนทับกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้วิธี Blood smear ร่วมด้วย หากจำนวนเกล็ดเลือดต่ำ

จากงานวิจัยของ Hanseler et.al, 1996 ศึกษาเกี่ยวกับการประเมินเกล็ดเลือดที่มีปริมาณเลือดน้อยโดยวิธีการนับเกล็ดเลือดด้วยตนเองและเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ การนับเกล็ดเลือดด้วยตนเองในที่นี้คือวิธีการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (Neubauer improved counting chamber) ผลการศึกษาพบว่าถ้าในกรณีที่มีปริมาณเลือดมากการนับเกล็ดเลือดโดยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติจะให้ผลที่มีความแม่นยำกว่า แต่กรณีที่มีเลือดในหลอดน้อยๆ ควรนับเกล็ดเลือดทั้ง 2 วิธีควบคู่กัน คือ เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติและการนับเกล็ดเลือดด้วยตนเอง (Neubauer improved counting chamber)

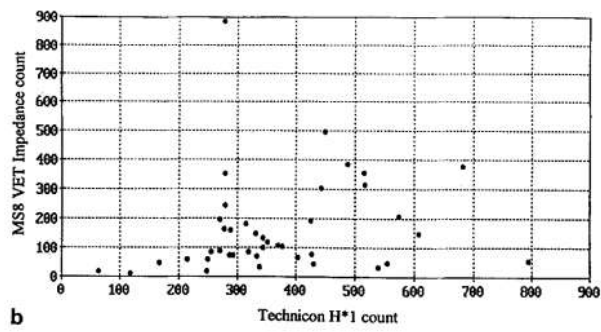
จากงานวิจัยของ Byrne et .al, 1994 ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Technicon H*1 และ AVL MS8 VET Analyzer โดยการสุ่มตัวอย่างเลือดสุนัข 67 ตัว และแมว 41 ตัว จากโรงพยาบาลสัตว์ West Bar ซึ่งบริเวณที่เจาะเก็บเลือดคือ หลอดเลือดดำที่คอ (Jugular Vein) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AVL MS8 VET ในวันที่ได้ตัวอย่างเลยทันที และมีตัวอย่างเลือดบางส่วนที่ได้จากสุนัขที่มีน้ำหนักมากกว่า 30 kg. บริเวณที่เจาะเก็บเลือดคือ หลอดเลือดดำที่ขาน้ำ (Cephalic Vein) เก็บไว้ในหลอด Tripotassium ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) แล้วจึงส่งตัวอย่างเลือดไปทางไปรษณีย์ ซึ่งถูกส่งภายใน 4 ชั่วโมง และตรวจวิเคราะห์ในวันถัดไป

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AVL MS8 VET และ Technicon H*1 ได้ค่าความเข้มข้นฮีโมโกลบิน (Hemoglobin concentrations), เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) และจำนวนเม็ดเลือดขาว (leucocyte) ของตัวอย่างเลือดสุนัขทั้งหมดแสดงความสัมพันธ์ที่ดี (good correlation) ซึ่งความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (g/l) เลือดสุนัข คือ n = 68; r = 0.93, เลือดแมว n = 41; r = 0.73, ความสัมพันธ์ของจำนวนเม็ดเลือดแดง ($\times 10^{12} /l$) เลือดสุนัข: n = 68; r = 0.96, เลือดแมว: n = 41; r = 0.79, ความสัมพันธ์ของเม็ดเลือดขาว ($\times 10^9/l$) จากเลือดสุนัข n = 68; r = 0.93, เลือดแมว: n = 41; r = 0.51 และเม็ดเลือดขาวชนิดเบซิฟิลจากเลือดแมว n = 17; r = 0.97 อีกทั้งมีความสัมพันธ์ที่เหมาะสมระหว่างจำนวนเกล็ดเลือด จากตัวอย่างเลือดสุนัข (รูปที่ 2.3) ที่ตรวจโดยเครื่องวิเคราะห์ทั้งสอง

แม้ว่าผลลัพธ์ในเลือดแมวจะไม่ดีเท่าเลือดสุนัข เนื่องจากในเลือดแมวจะเกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด ทำให้ถูกเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติแปลผลเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวแทน แต่ก็ยังเห็นความสัมพันธ์ที่น่าพอใจสำหรับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดง



รูปที่ 2.3 ความสัมพันธ์ของจำนวนเกล็ดเลือด ($\times 10^9/l$). เลือดสุนัข : $n = 68, r = 0.76$.



รูปที่ 2.4 ความสัมพันธ์ของจำนวนเกล็ดเลือด ($\times 10^9/l$). เลือดแมว: $n = 41, r = 0.19$

ตารางที่ 2.3 สรุปผลวิธีการประเมินเกล็ดเลือด

Research topics	Research Result			Author
	Manual method		automated	
	Blood Smear	Chamber		
Comparison of Two Platelet Count Estimation Methodologies for Peripheral Blood Smears (Blood smear / Coulter LH750 analyser)	/		/	Malok et.al, 2007
Evaluation of methods of platelet counting in the cat (การประเมินเกล็ดเลือดในแมว)	/	/		Tasker et.al, 2001
Prevalence of Low Automated Platelet Counts in Cats: Comparison with Prevalence of Thrombocytopenia Based on Blood Smear Estimation	/		/	Norman et.al, 2001
Estimation of the Lower Limits of Manual and Automated Platelet Counting (Neubauer improved counting chamber/ Automated)		/	/	Hanseler et.al, 2003

ตารางที่ 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อภาวะเกล็ดเลือดต่ำ

Research topics	Research Result	Author
Laboratory Evaluation of Hemorrhagic Coagulopathies in Small Animal Practice	สารการแข็งตัวของเลือดในหลอด EDTA มีผลต่อการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในแมวมากกว่าสุนัข	Parry, 1989
Method of measuring platelet activation (วิธีประเมินเกล็ดเลือด)	เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ใกล้เคียงกันทำให้การประเมินเกล็ดเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติมีความคลาดเคลื่อนสูงในแมว	Zelmanovic et.al, 1998
Advances in Platelet Counting (ความก้าวหน้าในการนับเกล็ดเลือด)	การประเมินเกล็ดเลือดโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) อาจเกิดความผิดพลาดคือ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ยังหลงเหลืออยู่อาจถูกเข้าใจผิดว่าเป็นเกล็ดเลือด (Harrison et.al, 2000)	Harrison et.al, 2000

บทที่ 3

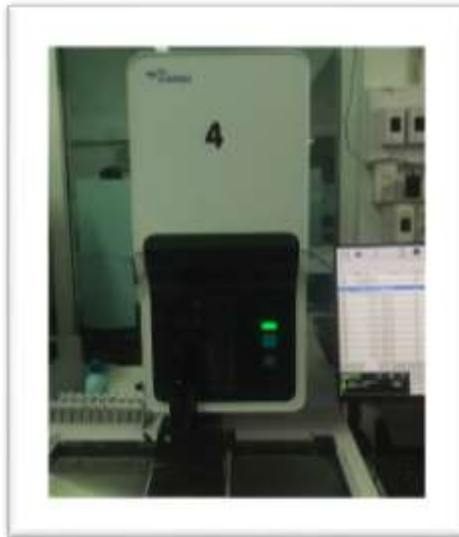
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง เป็นการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มที่ส่งมาตรวจ CBC ที่ Vet central lab เก็บตัวอย่างเลือด 200 ตัวอย่าง (สุนัข 100 ตัวและแมว 100 ตัว) ที่เก็บไว้ในหลอด EDTA

3.2 การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

3.2.1 เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (automated hematology analyzer)

นำตัวอย่างเลือดจากหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer



รูปที่ 3.1 เครื่อง Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer

3.2.2 การนับแบบประมาณการ (Estimate platelet number) Thin Blood smear โดยนำตัวอย่างเลือดจากหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA หยดเลือดลงบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ capillary tube จากนั้นใช้แผ่นปิดสไลด์ วางหน้าหยดเลือดโดยทำมุม 30-45 องศา และทำการสเมียร์เลือดไปข้างหน้า ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จากนั้นรอแผ่นสเมียร์เลือดแห้งและ Fix ด้วย Methanol 5-10 วินาที แล้วนำไปย้อมด้วยสี Modified-Wrights Giemsa



รูปที่ 3.2 แผ่นสเมียร์เลือด (Thin blood smear)

จากนั้นนำสไลด์ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X นับเกล็ดเลือดเฉลี่ย 10 oil files นำจำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้มารวมกันแล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคูณ 2000 จะได้ค่าประมาณการของเกล็ดเลือด และทำ thin blood smear 2 ซ้ำ

3.2.3 การนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer)
นำเลือดที่บรรจุในหลอด EDTA ทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ เพื่อทำการเจือจางเลือด

3.2.3.1 ดูดเลือดถึงขีด 1.0 (เช็ดปิเปตให้สะอาดและซับเลือดส่วนเกิน)

3.2.3.2 ดูดน้ำยาเจือจาง แอมโมเนียมอีอกซาเลต 1 % ถึงขีด 101 ในอัตราส่วน 1:100



รูปที่ 3.3 เจือจางเลือดในแอมโมเนียมอีอกซาเลต 1 %

3.2.3.3 Mix ไปมา แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา ซึ่งแอมโมเนียมอีอกซาเลต 1 % จะสลายเม็ดเลือดแดง



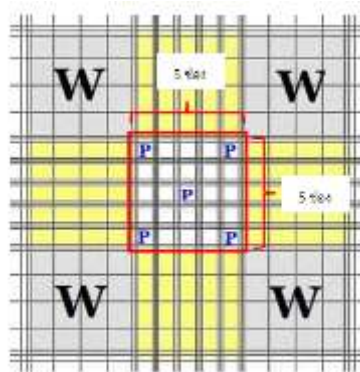
รูปที่ 3.4 เจือจางเลือดในปิเปตแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

3.2.3.4 หลังจากนั้นหยด Solution จากปิเปต 7-9 หยดทิ้งไปเพราะส่วนนี้ไม่ได้ผสมกับเลือด แล้วนำไปหยดลงตรงร่องของ counting chamber ที่ปิด cover chamber ไว้เรียบร้อยแล้ว ค่อยๆหยดให้เต็มพอดี แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในที่ที่มีความชื้นใน plate ที่มีสาลีชุบน้ำรองไว้



รูปที่ 3.5 บ่มในจานเพาะเชื้อที่มีความชื้น

3.2.3.5 แล้วย้นำ counting chamber ไปนับจำนวนเกล็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40x นับในช่อง P ของ counting chamber ซึ่งนับ 5 ช่อง นับบริเวณเช่นเดียวกับช่องเม็ดเลือดแดง (ควรนับอย่างน้อย 10 ช่อง) (แนะนำนับ 25 ช่อง) นำจำนวนที่นับได้มารวมกันแล้วคำนวณเป็นจำนวนเกล็ดเลือดต่อ 0.1 ลบ.มม.



รูปที่ 3.6 นับจำนวนเกล็ดเลือดในบริเวณช่องเม็ดเลือดแดง นับ 5 ช่อง

ที่มา: Batra, Online. 2018

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis) ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และจาก counting chamber กับวิธีที่ได้จาก thin blood smear ด้วย Pearson's correlation coefficient เพื่อดูความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear correlation) ระหว่างค่าที่ได้จากทั้ง 3 วิธี สำหรับความสอดคล้อง (agreement) ของค่าที่ได้จากวิธีทั้ง 3 นั้นจะใช้ Intraclass-correlation coefficient (ICC) แบบ Two-way mixed effect ด้วย absolute agreement (Dohoo et al., 2014) โดยการแปลผลค่า ICC จะได้เป็น < 0.5 คือ poor 0.5 – 0.75 คือ moderate 0.75 – 0.9 คือ good และ > 0.9 คือ excellence (Koo and Li, 2016) และแสดงความสอดคล้องในรูปแบบของ Bland-Altman plot เพื่อประเมินความแตกต่างว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้หรือไม่ (limit of agreement) โดยที่เป็นการสร้างกราฟระหว่างความแตกต่างของค่าที่ได้จากวิธีทั้ง 3 และค่าเฉลี่ยของค่าที่ได้จากวิธีทั้ง 3 โดยเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง $\pm 2SD$ (Bland and Altman, 1986) นอกจากนี้ค่าความแตกต่างของค่าที่ได้จาก 3 วิธีจะทำการตรวจสอบการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnov test และ Q-Q plot อคติ (bias) ที่เกิดขึ้นระหว่างวิธีทั้ง 3 นั้นจะทำการตรวจสอบด้วย one-sample t-test ว่ามีความแตกต่างจาก 0 หรือไม่ คำนัยสำคัญของการวิเคราะห์นี้ตั้งไว้ที่ 0.05 การวิเคราะห์สถิติทำด้วย SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0. Armonk, NY: IBM Corp)

บทที่ 4

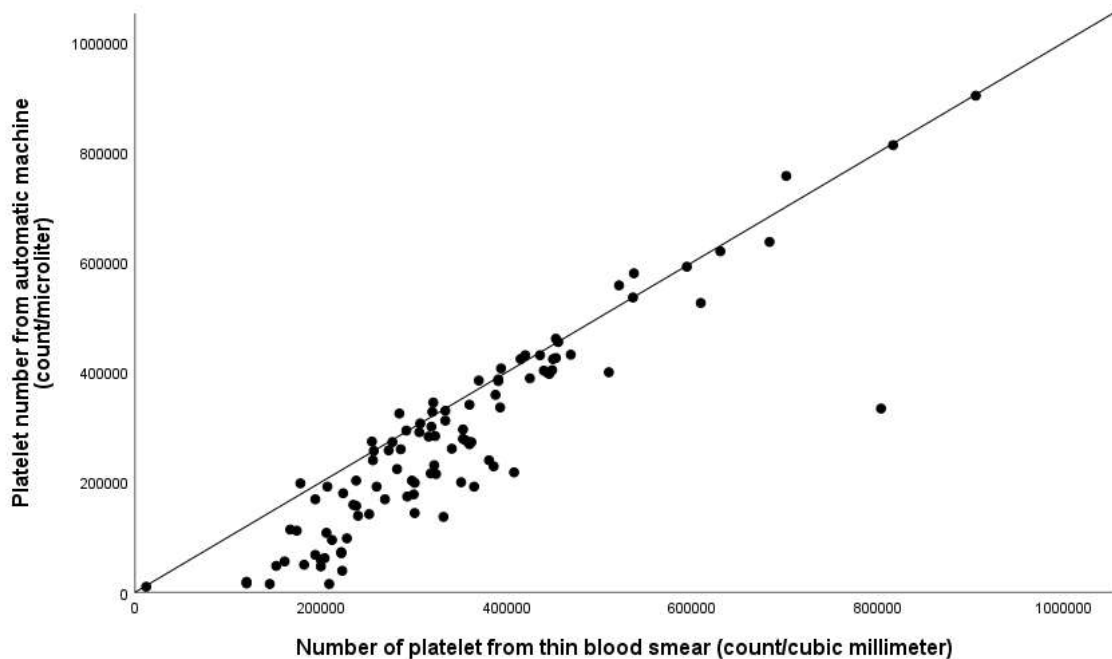
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดสอบความสอดคล้อง (agreement test) ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และจาก counting chamber กับวิธีที่ได้จาก thin blood smear ด้วยสถิติ Pearson's correlation coefficient (Pearson' r) และ intraclass correlation coefficient (ICC) แบบ two-way mixed ในรูปแบบ consistency โดยที่สถิติ Pearson's r นั้นจะเป็นการตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างค่าจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากทั้ง 3 วิธีว่ามีความสัมพันธ์ในทิศทางและระดับใดโดยที่วิธีนี้ไม่ได้เกี่ยวข้องกับความสอดคล้องโดยตรง การทดสอบความสอดคล้องโดยตรงใช้สถิติทดสอบ intraclass correlation coefficient (ICC) แบบ two-way mixed ในรูปแบบ consistency โดยการแปลผลค่า ICC นั้นหาก ICC น้อยกว่า 0.5 เป็น poor 0.5 – 0.75 เป็น moderate 0.75-0.9 เป็น good และมากกว่า 0.90 เป็น excellent จากนั้นทำการตรวจสอบอคติ (bias) ของความแตกต่างของวิธีทั้ง 3 วิธีและการสร้างขอบเขตที่ยอมรับ (limit of agreement) ด้วย Bland-Altman limit of agreement plot โดยที่แกน Y เป็นค่าความแตกต่างของค่าจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากทั้ง 2 วิธีของคู่เปรียบเทียบ และแกน X เป็นค่าเฉลี่ยของค่าจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากทั้ง 2 วิธีของคู่เปรียบเทียบ ทำการสร้างเส้นที่ค่าความแตกต่างเฉลี่ยของค่าจำนวนเกล็ดเลือดและขอบเขตที่ยอมรับได้อยู่ที่ ค่าเฉลี่ยความแตกต่าง $\pm 1.96 \times$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง (SD)

ผลการศึกษา

4.1 การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis) ของจำนวนเกล็ดเลือดในสุนัข

4.1.1 ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้อง (agreement test) ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear



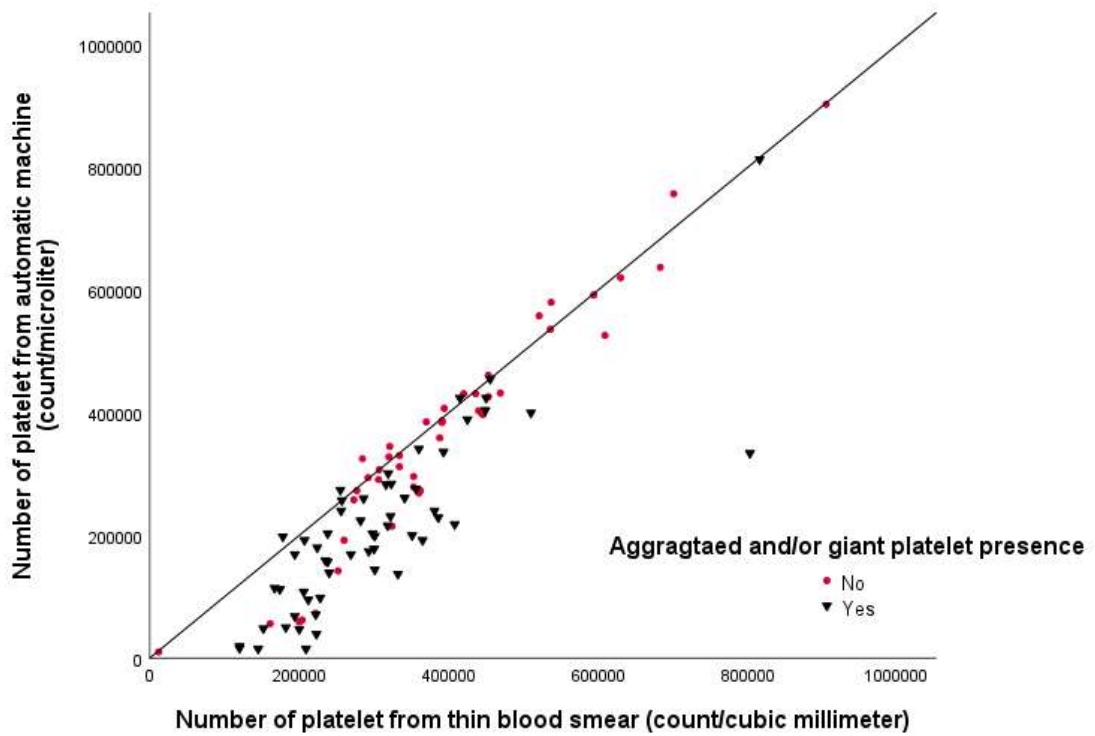
รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear

Agreement plot ได้ตามภาพแนวนอนจำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine จะน้อยกว่าของ thin blood smear (ดังรูป 4.1) ที่เป็นเช่นนี้ก็เนื่องมาจากมีการตรวจพบ giant plate และหรือ aggregated platelet ในตัวอย่างเลือดดังกล่าว แต่หากตัวอย่างไม่มี giant platelet และหรือ aggregated platelet ส่วนมากจะให้ค่าใกล้เคียงกัน

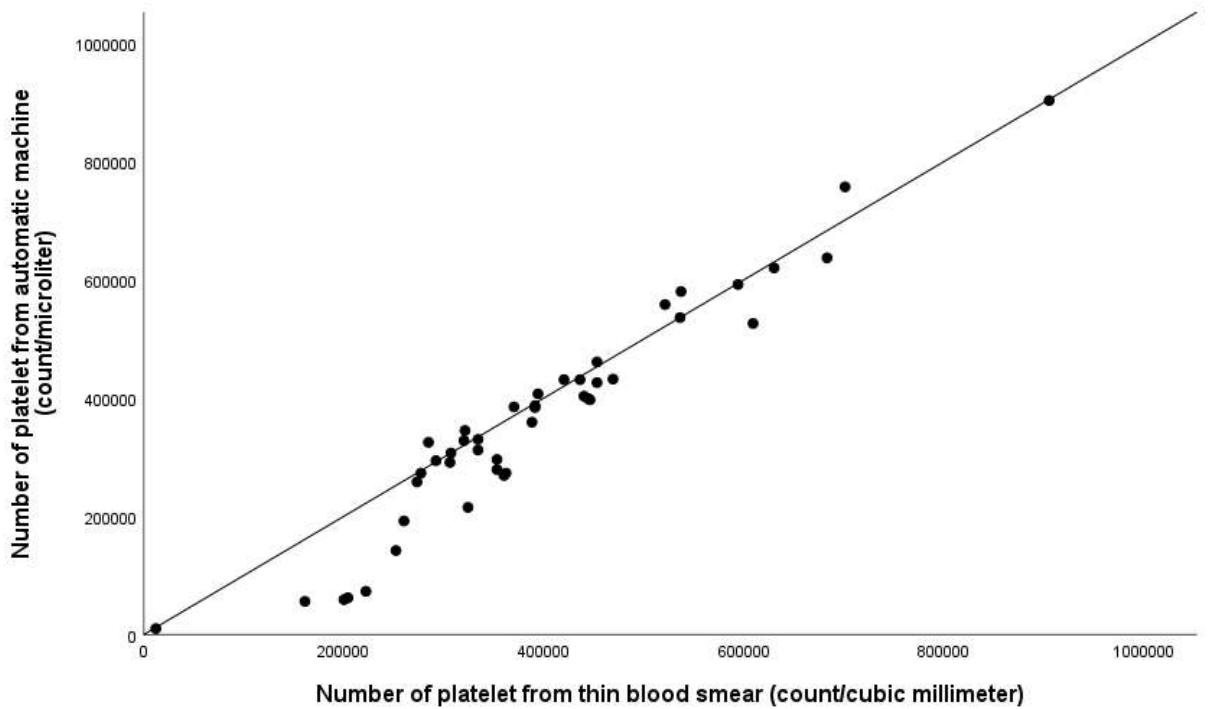
ได้ค่า Pearson's $r = 0.911$ ($p\text{-value} < 0.01$) และค่า ICC = 0.900 ($p\text{-value} < 0.001$)

เมื่อพิจารณาในส่วน of ตัวอย่างที่ไม่มีการพบ giant platelet และหรือ aggregated platelet พบว่า ได้ค่า Pearson's $r = 0.965$ ($p\text{-value} < 0.001$) และค่า ICC = 0.955 ($p\text{-value} < 0.001$)

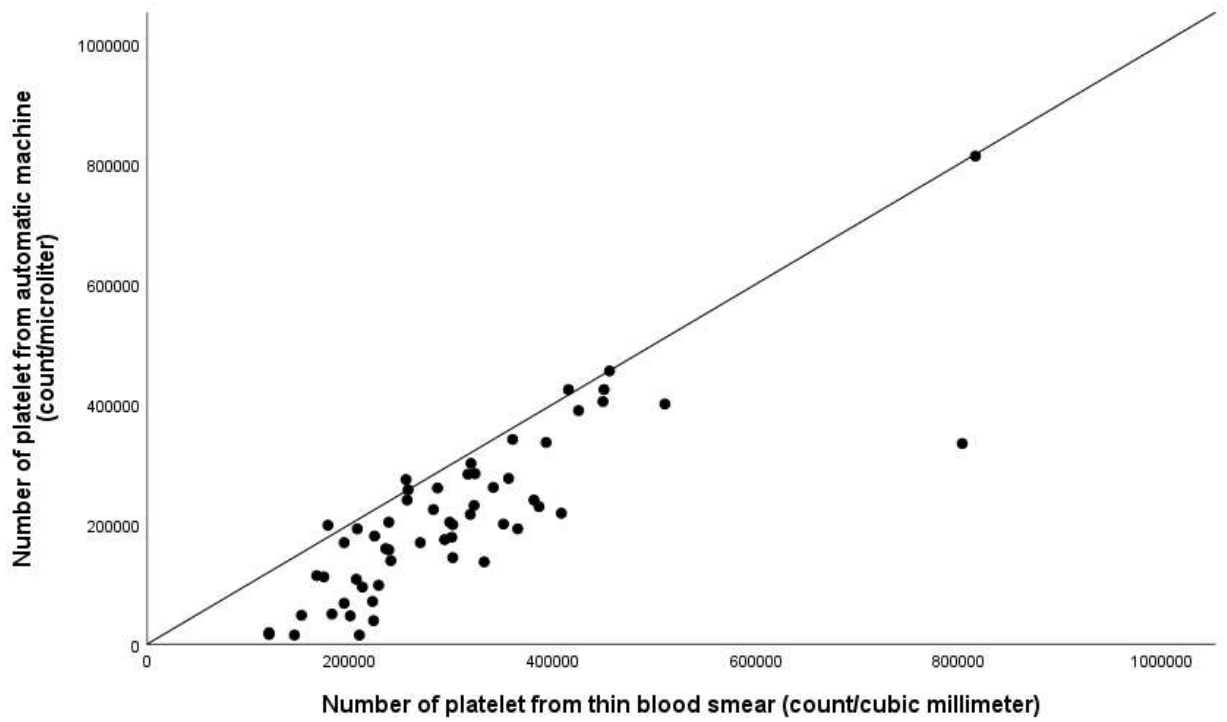
และเมื่อพิจารณาในส่วน of ตัวอย่างที่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet พบว่า ได้ค่า Pearson's $r = 0.839$ ($p\text{-value} < 0.001$) และค่า ICC = 0.839 ($p\text{-value} < 0.001$)



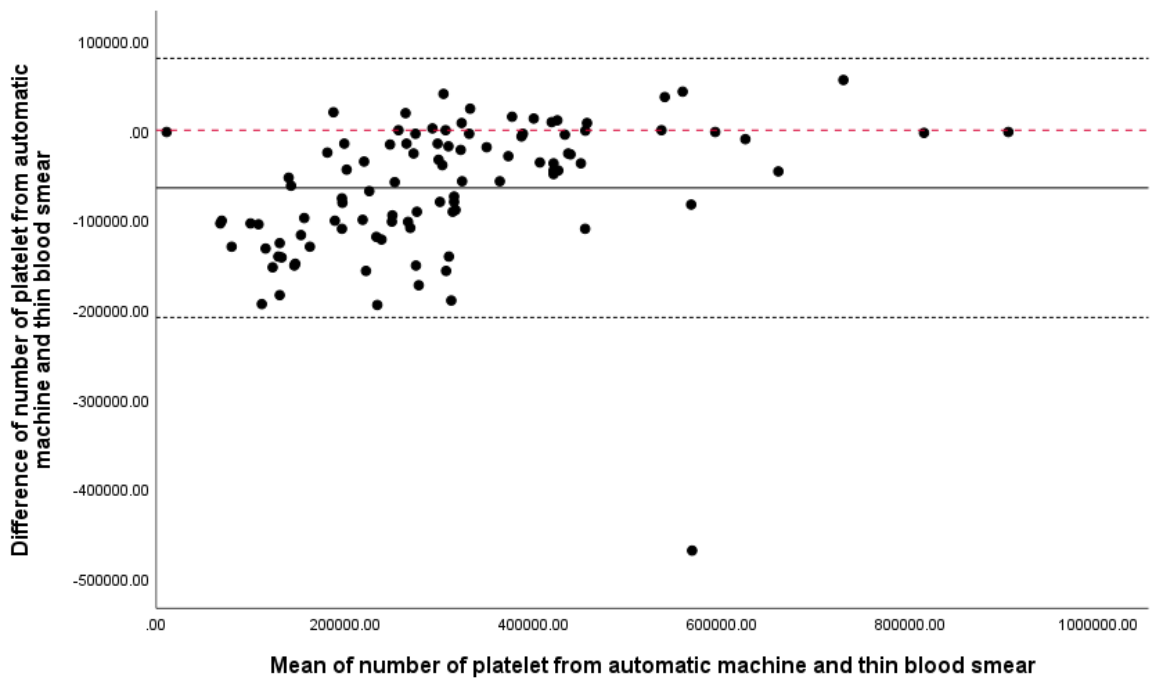
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear จากตัวอย่างที่พบและไม่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet



รูปที่ 4.3 กรณีไม่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet



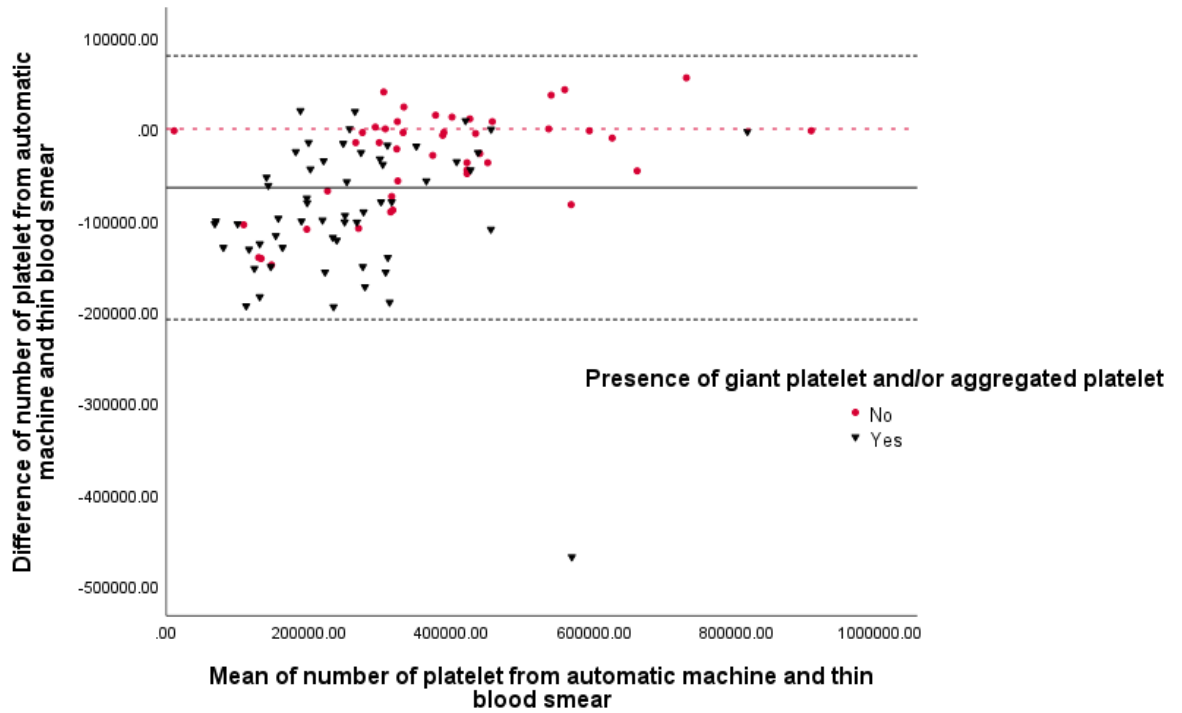
รูปที่ 4.4 กรณีพบ giant platelet และหรือ aggregated platelet



รูปที่ 4.5 Bland-Altman plot

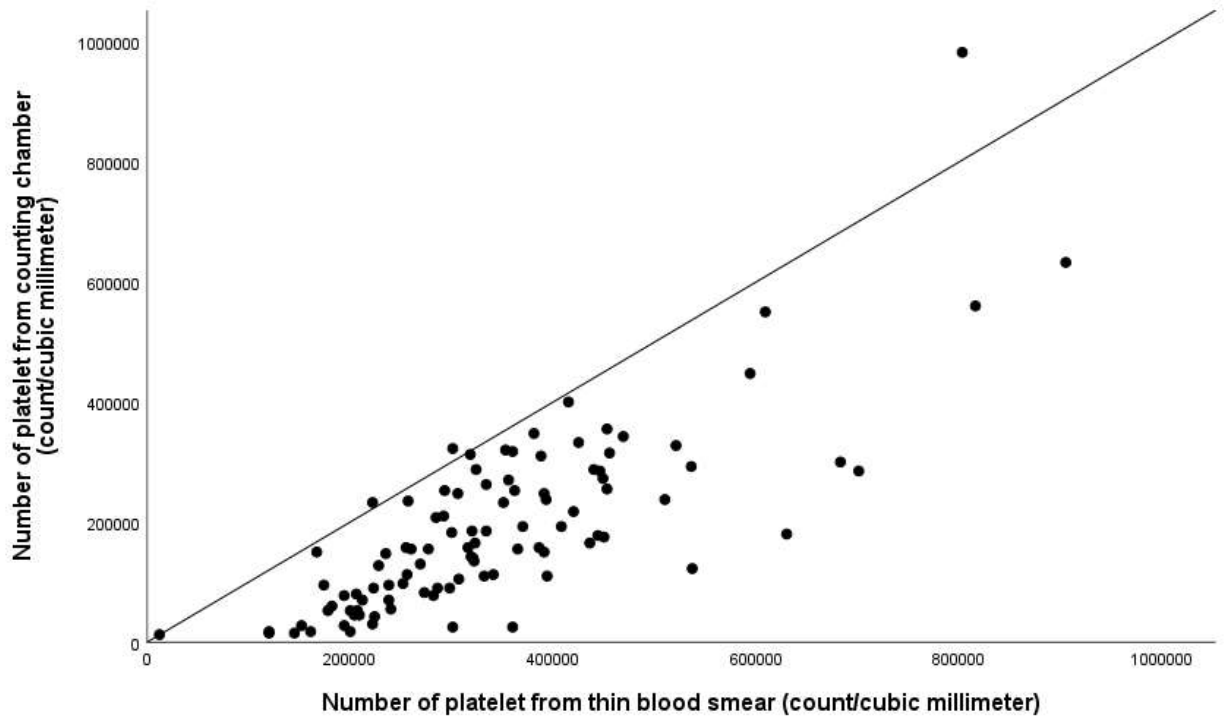
จาก Bland-Altman plot จะพบว่าโดยส่วนมากค่าที่ได้จะอยู่ใน limit of agreement โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ $-64,368.91$ platelet ค่า SD เท่ากับ $73,713.87$ platelet

สรุป แม้ว่าเครื่อง automatic machine จะให้ค่าสอดคล้องกับวิธี thin blood smear แต่จะพบว่ามี bias โดยเฉลี่ยที่ประมาณ $64,000$ platelet และแนวโน้มจะมีปัญหาที่ platelet น้อยกว่า 400 ดังนั้นจึงควรต้องมีการทำ platelet count ควบคู่ด้วย



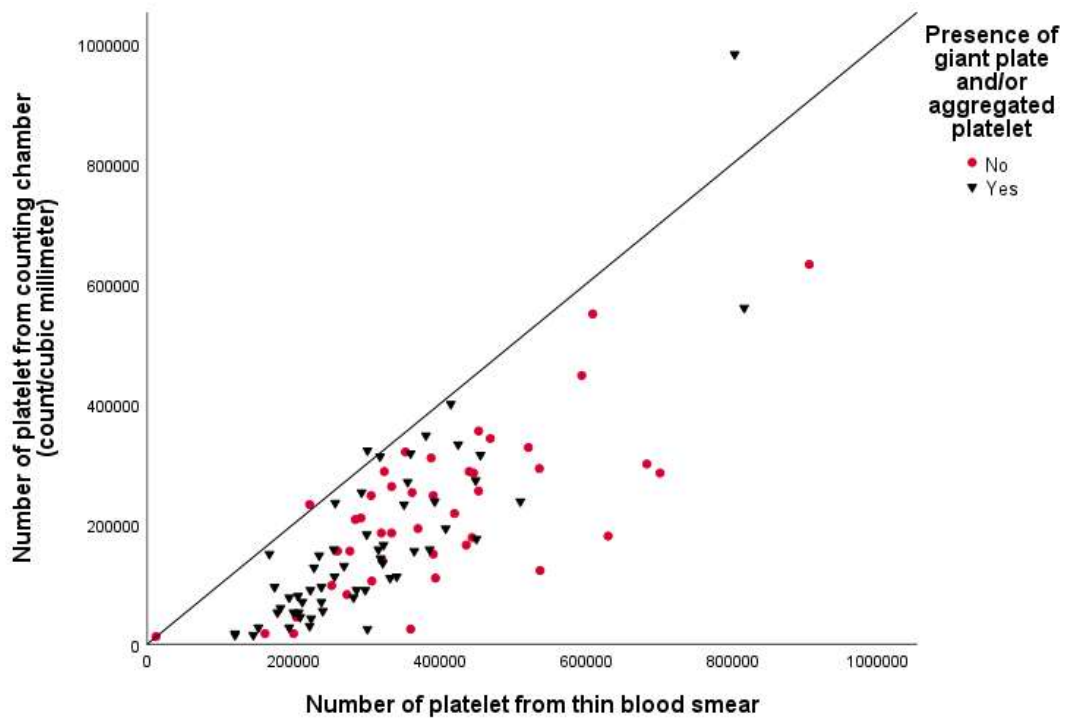
รูปที่ 4.6 Bland-Altman plot แสดงกลุ่มที่พบและไม่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet และไม่พบ

4.1.2 ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้อง (agreement test) ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber และ thin blood smear

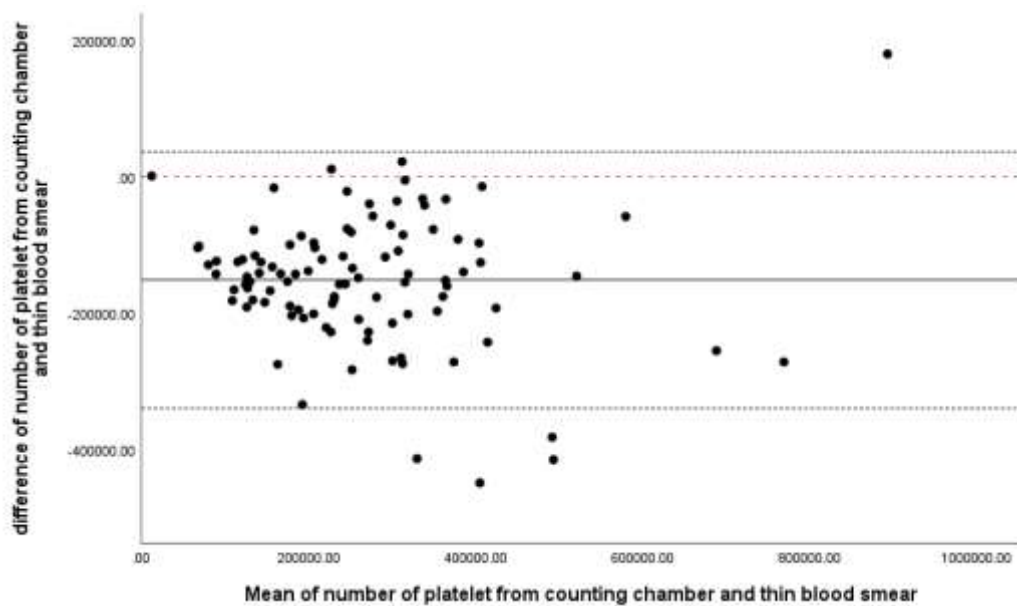


รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber และ thin blood smear

ได้ค่า Pearson's $r = 0.797$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.797 (p-value < 0.001)
เมื่อพิจารณาในส่วนของตัวอย่างที่ไม่มีพบ giant platelet และหรือ aggregated platelet พบว่าได้ค่า Pearson's $r = 0.736$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.721 (p-value < 0.001)
และเมื่อพิจารณาในส่วนของตัวอย่างที่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet พบว่า
ได้ค่า Pearson's $r = 0.859$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.846 (p-value < 0.001)



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber และ thin blood smear ตัวอย่างที่พบและไม่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet

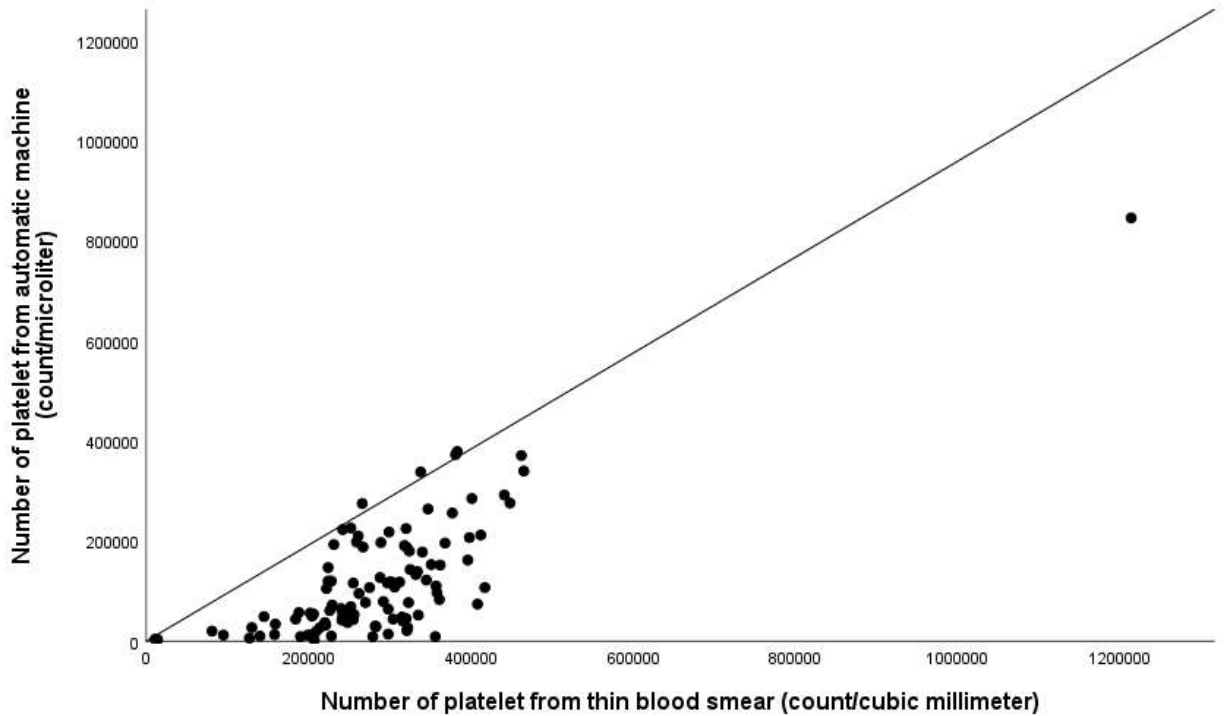


รูปที่ 4.9 Bland-Altman plot จาก Counting chamber และ thin blood smear

จาก Bland-Altman plot จะพบว่าโดยส่วนมากค่าที่ได้จะอยู่ใน limit of agreement โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ -152052.6 platelet ค่า SD เท่ากับ 96005.5 platelet

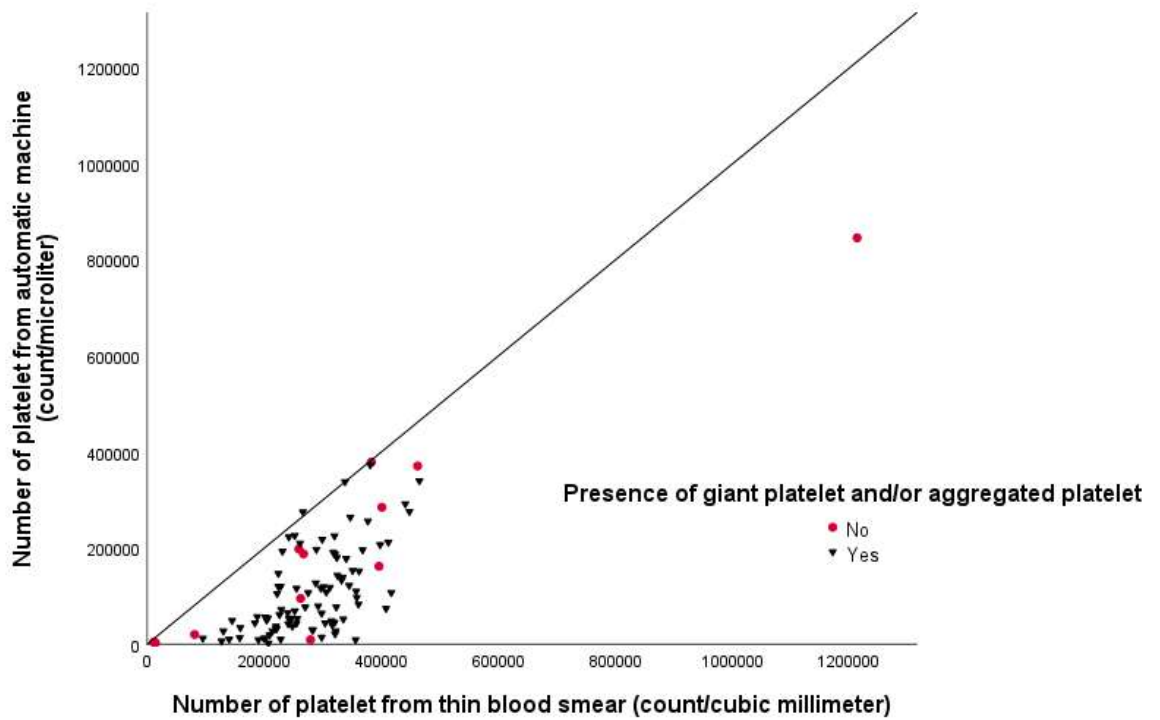
4.2 การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis) ของจำนวนเกล็ดเลือดในแนว

4.2.1 ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้อง (agreement test) ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear

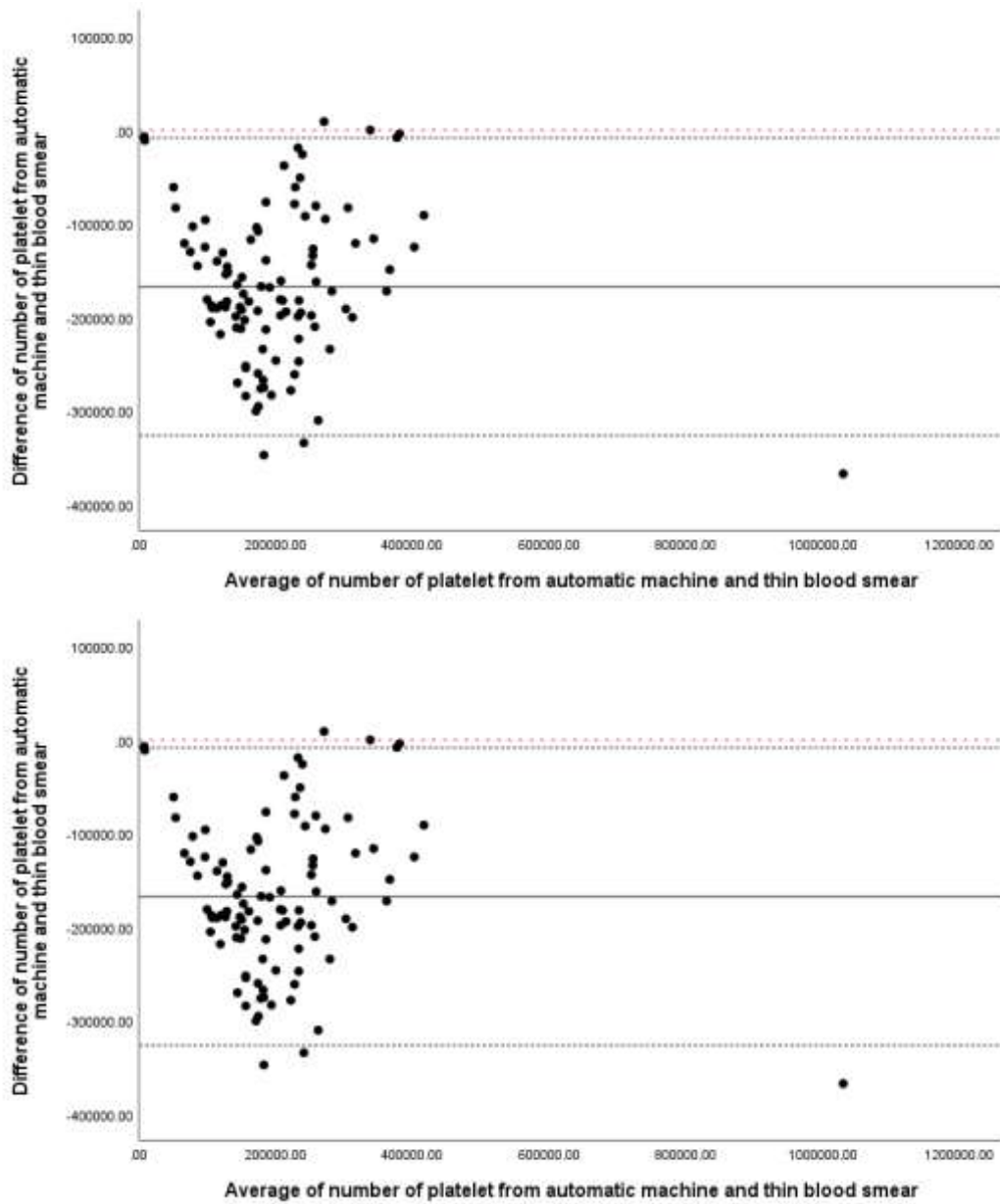


รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear

ได้ค่า Pearson's $r = 0.787$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.785 (p-value < 0.001)
เมื่อพิจารณาในส่วนของตัวอย่างที่ไม่มี การพบ giant platelet และหรือ aggregated platelet พบว่าได้ค่า Pearson's $r = 0.948$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.916 (p-value < 0.001)
และเมื่อพิจารณาในส่วนของตัวอย่างที่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet พบว่า
ได้ค่า Pearson's $r = 0.603$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.597 (p-value < 0.001)



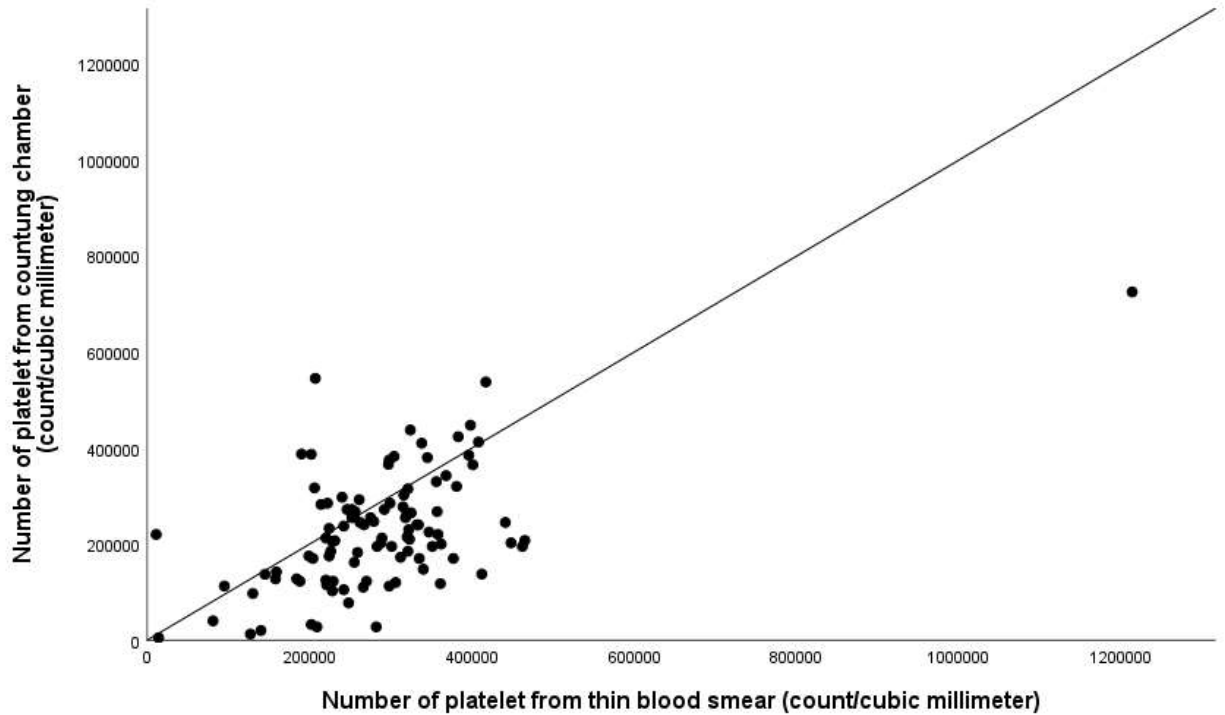
รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear จากตัวอย่างที่พบและไม่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet



รูปที่ 4.12 Bland-Altman plot

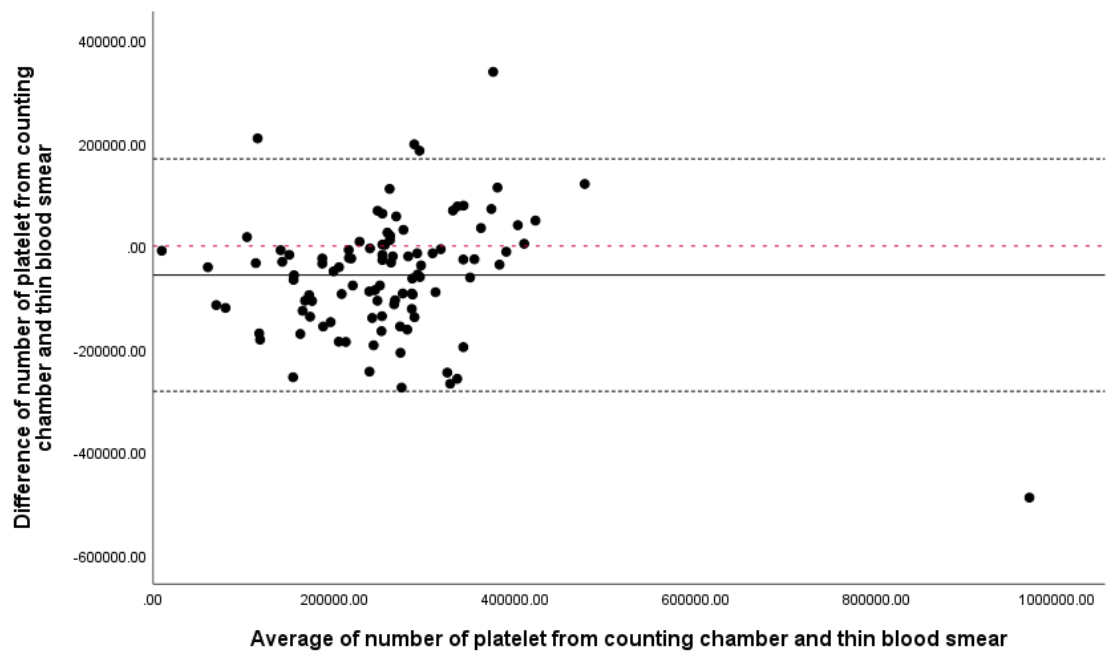
จาก Bland-Altman plot จะพบว่าโดยส่วนมากค่าที่ได้จะอยู่ใน limit of agreement โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ -167223.30 platelet ค่า SD เท่ากับ 81017.17 platelet

4.2.2 ผลการเปรียบเทียบความสอดคล้อง (agreement test) ของจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber และ thin blood smear



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber และ thin blood smear

ได้ค่า Pearson's $r = 0.574$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.573 (p-value < 0.001) เมื่อพิจารณาในส่วนของตัวอย่างที่ไม่มี การพบ giant platelet และหรือ aggregated platelet พบว่าได้ค่า Pearson's $r = 0.889$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.785 (p-value < 0.001) และเมื่อพิจารณาในส่วนของตัวอย่างที่พบ giant platelet และหรือ aggregated platelet พบว่า ได้ค่า Pearson's $r = 0.384$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.361 (p-value < 0.001)



จาก Bland-Altman plot จะพบว่าโดยส่วนมากค่าที่ได้จะอยู่ใน limit of agreement โดยพบว่ามีความเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ -56264.70 platelet ค่า SD เท่ากับ 115071.04 platelet

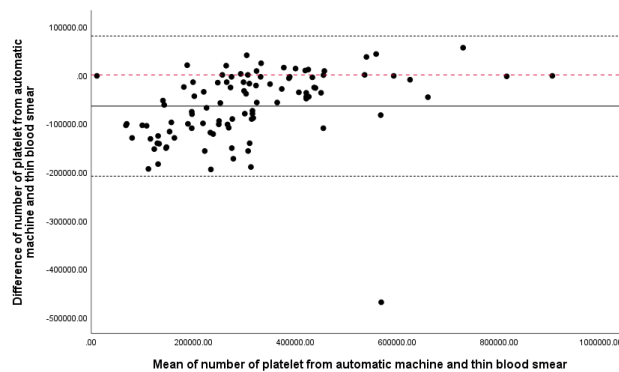
บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล

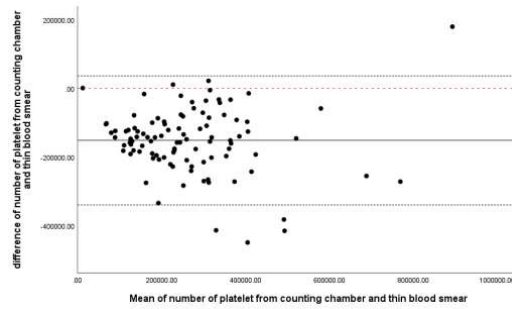
5.1.1 การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis) ของจำนวนเกล็ดเลือดในสุนัข

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการนับเกล็ดเลือดด้วยวิธีการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) การนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) ในสุนัขพบว่าความสัมพันธ์การนับเกล็ดเลือดโดยวิธีการนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) มีความสอดคล้องกันดีมากโดยมีค่า Pearson's $r = 0.911$ ($p\text{-value} < 0.01$) และค่า ICC = 0.900 ($p\text{-value} < 0.001$) ค่าจาก Bland-Altman plot (รูปที่ 5.1) จะพบว่าโดยส่วนมากค่าที่ได้จะอยู่ใน limit of agreement โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ $-64,368.91$ platelet ค่า SD เท่ากับ $73,713.87$ platelet



รูปที่ 5.1 Bland-Altman plot จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear จากตัวอย่างเลือดสุนัข

การนับเกล็ดเลือดในสุนัขโดยวิธีการนับเกล็ดเลือดโดยการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) มีความสอดคล้องกันดีโดยมีค่า Pearson's $r = 0.797$ ($p\text{-value} < 0.001$) ค่า ICC = 0.797 ($p\text{-value} < 0.001$) ค่าจาก Bland-Altman plot (รูปที่ 5.2) จะพบว่าโดยส่วนมากค่าที่ได้จะอยู่ใน limit of agreement โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ -152052.6 platelet ค่า SD เท่ากับ 96005.5 platelet

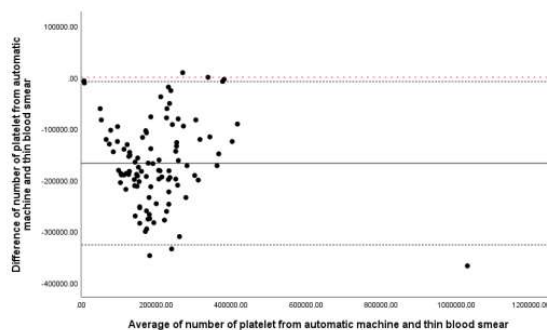


รูปที่ 5.2 Bland-Altman plot จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber และ thin blood smear จากตัวอย่างเลือดสุนัข

สรุป แม้ว่าเครื่อง automatic machine จะให้ค่าสอดคล้องกับวิธี thin blood smear แต่จะพบว่ามี bias โดยเฉลี่ยที่ประมาณ 64,000 platelet และแนวโน้มจะมีปัญหาที่ platelet น้อยกว่า 400 ดังนั้นจึงควรต้องมีการทำ platelet count ควบคู่ด้วย

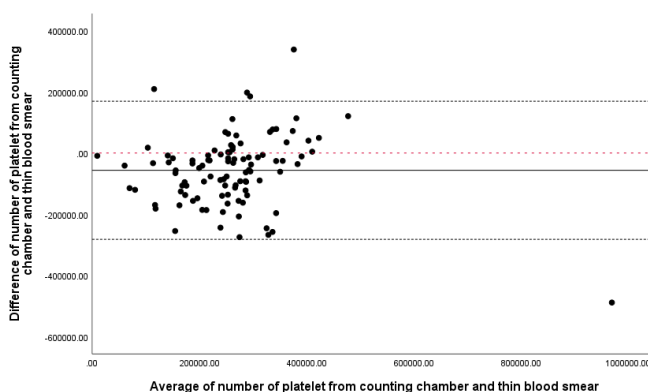
5.1.2 การเปรียบเทียบการสอดคล้อง (agreement analysis) ของจำนวนเกล็ดเลือดในแมว

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการนับเกล็ดเลือดด้วยวิธีการประมาณการจำนวนเกล็ดเลือดจากการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) การนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) ในแมวพบว่าความสัมพันธ์การนับเกล็ดเลือดโดยวิธีการนับเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) มีความสอดคล้องกันดี โดยมีค่า Pearson's $r = 0.787$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.785 (p-value < 0.001) ค่าจาก Bland-Altman plot (รูปที่ 5.3) จะพบว่าโดยส่วนมากค่าที่ได้จะอยู่ใน limit of agreement โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ -167223.30 platelet ค่า SD เท่ากับ 81017.17 platelet



รูปที่ 5.3 Bland-Altman plot จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่อง automatic machine และ thin blood smear จากตัวอย่างเลือดแมว

การนับเกล็ดเลือดในสุนัขโดยวิธีการนับเกล็ดเลือดโดยการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) มีความสอดคล้องกันดีโดยมีค่า Pearson's $r = 0.574$ (p-value < 0.001) ,ค่า ICC = 0.573 (p-value < 0.001) ค่าจาก Bland-Altman plot (รูปที่ 5.4) จะพบว่าโดยส่วนมากค่าที่ได้จะอยู่ใน limit of agreement โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ -56264.70 platelet ค่า SD เท่ากับ 115071.04 platelet



รูปที่ 5.4 Bland-Altman plot จำนวนของเกล็ดเลือดที่ได้จาก Counting chamber และ thin blood smear จากตัวอย่างเลือดแมว

ผลการศึกษาพบว่าการนับเกล็ดเลือดในสุนัขโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer และการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) มีความสอดคล้องกันพบว่าจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่องนับเกล็ดเลือดอัตโนมัติจะน้อยกว่าการสเมียร์เลือดโดยมีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ 64,368.91 platelet ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Molok et.al, 2007 ที่พบว่าการประมาณจำนวนเกล็ดเลือดด้วยวิธีดั้งเดิมโดยทั่วไปจะสูงกว่าการนับอัตโนมัติเล็กน้อย แต่มีความแม่นยำเพียงพอที่จะให้การประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจาก blood smear เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพแต่จะพบว่าเมื่อใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Automated Hematology Analyzer ในแมวจะพบว่าจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่องนับเกล็ดเลือดอัตโนมัติจะน้อยกว่าการสเมียร์เลือดโดยมีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ 167223.30 platelet ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Norman et.al, 2001 และ Byrne et.al, 1994 พบว่า การนับเกล็ดเลือดโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติความชุกของภาวะเกล็ดเลือดต่ำในแมวสูงถึง 71% ในขณะที่ความชุกของภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากการสเมียร์เลือดมีเพียง 3.1% เนื่องจากเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดแดงมีขนาดที่ใกล้เคียงกันและพบการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (giant platelet) และหรือพบเกล็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ (aggregated platelet) ที่พบได้บ่อยในแมว

ผลการศึกษาพบว่า การนับเกล็ดเลือดในสุนัขโดยการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) จะพบว่าจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือดจะน้อยกว่าการสเมียร์เลือด โดยมีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับโดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ 152052.6 platelet ซึ่งต่างจากการนับเกล็ดเลือดในแมวโดยการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) พบว่าจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือดจะน้อยกว่าการสเมียร์เลือด โดยมีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับโดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับ 56264.70 platelet : ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tasker et.al, 2001 วัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ของการนับเกล็ดเลือดในแมวโดยวิธีต่างๆ คือ การนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer), การนับแบบประมาณการจากการสเมียร์เลือดและเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติรุ่นต่างๆ พบว่าการนับเกล็ดเลือดโดยการสเมียร์เลือด (estimate platelet number) และการนับโดยใช้แผ่นกระจกนับเม็ดเลือด (platelet count using hemocytometer) มีความสัมพันธ์สูงสุด ($r = 0.776$)

ปัจจุบันได้มีการนำเครื่องตรวจเลือดอัตโนมัติทางโลหิตวิทยา มาใช้เป็น in house lab กันอย่างแพร่หลาย ผลการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดจากเครื่องตรวจเลือดอัตโนมัติมักให้ผลคลาดเคลื่อนน้อยกว่าความเป็นจริง ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะที่ผิดปกติของเกล็ดเลือด เช่น giant platelet, clumping platelet เป็นต้น ดังนั้นการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดโดยการทำ stained thin blood smear และตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์จะให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำกว่า ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ได้นำเสนอ และแสดงผลให้เห็นว่า การตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดควรใช้ทั้ง 2 วิธีควบคู่กันไปเพื่อให้สัตวแพทย์วินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง และเป็นการตอกย้ำให้เห็นว่าทาง Vet Central lab ตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดทั้งสองวิธีควบคู่กันในทุกกรณี เพื่อคงมาตรฐานการให้บริการต่อไป และสื่อสารให้ลูกค้าเข้าใจด้วยผลทางสถิติที่ทางแล็บทำขึ้น

บรรณานุกรม

- Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 2005;353:498-507.
- Brecher, G., Schneiderman, M. and Cronkite, E. P. (1953). The reproducibility of the platelet count, *American Journal of Clinical Pathology*, 23, 15-21.
- England, J. M., Rowan, R. M., Bins, M., Bull, B. S., Groner, W., Jones, A. R., Koepke, J. A., Lewis, S. M., Thom, R., Van Assendelft, O. W. and Verwilghen, R. L. (1998). Recommended methods for the visual determination of white cell and platelet counts, *WHO LAB*, 88, 1.
- Hanseler, E. et al. Estimation of the lower limits of manual and automated platelet counting. *Am. J. Clin. Pathol.*, 105(6): 782-87, 1996.
- Harrison, P., Briggs, C., & Machin, S. (2001). Advances in platelet counting. *Hematology*, 5(6), 421-427.
- Jung S, Chae H, Lim J, Oh EJ, Kim Y, Park YJ, et al. Differential blast counts obtained by automated blood cell analyzers. *Korean J Lab Med* 2010;30:540 – 6.
- Koo TK and Li MY. 2016. A Guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med*. 15(2): 155-163.
- Malok, M., Titchener, E. H., Bridgers, C., Lee, B. Y., & Bamberg, R. (2007). Comparison of two platelet count estimation methodologies for peripheral blood smears. *American Society for Clinical Laboratory Science*, 20(3), 154-160.
- Norman, E. J., Barron, R. C., Nash, A. S., & Clampitt, R. B. (2001). Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Veterinary Clinical Pathology*, 30(3), 137-140.
- PARRV, B. W. (1989) Laboratory evaluation of hemorrhagic coagulopathies in small animal practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 19, 723-742
- Platelet number. (n.d.).
[Online]. Available <https://eclinpath.com/hemostasis/tests/platelet-number/>
- Zelmanovic, D., & Hetherington, E. J. (1998). Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Veterinary clinical pathology*, 27(1), 2-9.