Thesis Title Enumeration of CD4+ T Lymphocytes in Whole Blood by Non-Flow Cytometric Method

Author Miss Phonethipsavanh Nouanthong

Degree Master of Science (Health Sciences)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk Chairperson

Prof. Dr. Thira Sirisanthana Member

Dr. Sawitree Chiampanichayakul Member

ABSTRACT

During HIV infection, absolute CD4+ T lymphocyte count is an important marker for assessing the degree of immune deterioration and speed of progression towards AIDS. It is also used as a marker for making decisions to initiate anti-retroviral treatment and monitoring the efficacy of the treatment. At present, flow cytometric method is the gold standard method for CD4+ T lymphocyte enumeration. This method is accurate, precise and reproducible. However, it requires expensive reagents and equipment as well as trained personnel. This made the flow cytometric method inaccessible in resource-constrained countries. Therefore, an alternative method for replacing flow cytometric method is urgently needed. The new technique should be inexpensive, simple, reliable, accessible and applicable for resource limited countries.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In this study, a new method and reagent for enumeration of CD4+ T lymphocytes in whole blood were developed. M450 epoxy beads were coated with the purified anti CD4 monoclonal antibody from clone MT4. The coated beads were then used to develop a non-flow cytometric method for determination of CD4+ lymphocytes. After optimization, a CD4 enumeration technique was developed and the procedure is as follows: In the test tube, blood was mixed with the MT4 coated beads. In the control tube, blood was diluted with PBS. Both tubes were then constantly rotated for 30 min at room temperature. After rotation, the test tube was placed on magnetic particle concentrator for 5 min and blood was then removed to new microtube, leaving attached cells-beads-magnet undisturbed. For the control tube, diluted control blood was transferred to a new micro-tube. Absolute lymphocyte numbers from both tubes were counted using automated hematology analyzer. The CD4+ T lymphocyte number was then calculated by subtracting absolute lymphocyte numbers of the control tube with those of the test tube. In this study, total of 195 samples including those of 17 healthy donors and 178 HIV-infected patients were used to validate the developed method. The result was demonstrated that the CD4+ T lymphocyte counts obtained by the developed method were comparable to the standard flow cytometry. By regression line analysis, a good correlation between those two methods was obtained ($r=0.91$, $Y=0.98X-0.09$). The Bland Altman analysis showed very low bias of average mean different at 7 cells/µl. 95% of population was accepted within ± 2 SD. At the threshold of 200 cells/µl, the sensitivity, specificity, accuracy, PPV and NPV of the developed method were 86%, 85%, 86%, 74% and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

93%, respectively. At the threshold of 350 cells/μl, the sensitivity, specificity, accuracy, PPV and NPV were 93%, 83%, 89%, 90% and 87%, respectively.

In summary, in this study, a new non-flow cytometric method for enumeration of CD4+ T lymphocytes was developed. This method is inexpensive with a simple procedure. Equipment requires an automated hematology analyzer, which is already available in most hospital laboratories. The developed method is therefore an alternative method for enumerating CD4+ T lymphocytes for accessing HIV/AIDS patients in resource-limited countries.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจนับจำนวนลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 ในเลือดโดยไม่ต้องใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

ผู้เขียน นางสาว พรทิพย์สวรรค์ นวลทอง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สุขภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	ประธานกรรมการ
ศ. นพ. ธีระ ศิริสันธนะ	กรรมการ
ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล	กรรมการ

บทคัดย่อ

การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ ชนิดซีดี 4 มีความสำคัญอย่างมากในการประเมินผลภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและระยะการดำเนินโรคของผู้ติดเชื้อเอชไอวี ตลอดจนใช้ในการพิจารณาตัดสินใจเริ่มการรักษาและติดตามผลการรักษาในผู้ป่วยเอดส์ ในปัจจุบันวิธีโฟลไซโทเมทรีนับเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำ และการตรวจด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยน้ำยาและเครื่องมือที่มีราคาแพง ตลอดจนต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ผ่านการอบรมมาเป็นอย่างดี ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้ไม่สามารถจัดบริการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 โดยวิธีโฟลไซโทเมทรีได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีข้อจำกัดทางด้านเศรษฐกิจและทรัพยากรบุคคล ดังนั้นการพัฒนาวิธีใหม่เพื่อใช้แทนวิธีโฟลไซโทเมทรี จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งวิธีใหม่นี้ควรมีราคาถูก ทำได้ง่าย รวดเร็ว และสามารถนำไปใช้ได้ในประเทศที่มีข้อจำกัดต่างๆ ดังกล่าวมาข้างต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการและน้ำยาขึ้นใหม่เพื่อใช้ในการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 ในเลือด การพัฒนาน้ำยาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้เคลือบเม็ด M450 epoxy beads ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อซีดี 4 โปรตีน โคลน MT4 จากนั้นนำน้ำยาที่เตรียมขึ้นมาไปพัฒนาเป็นวิธีตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 โดยไม่อาศัยเครื่องโฟลไซโตมีเตอร์ วิธีที่พัฒนาขึ้นมีขั้นตอนดังนี้ ในหลอดทดสอบ ทำการผสมเลือดกับ MT4 bead ส่วนหลอดควบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คุม ทำการเจือจางเลือดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ในอัตราส่วนที่เท่ากัน นำหลอดทั้งสองไปผสมเลือดให้เข้ากันโดยใช้เครื่องหมุนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดทดสอบไปวางติดกับแท่งแม่เหล็ก (Magnetic particle concentrator) เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเลือดไปใส่หลอดใหม่โดยไม่ให้กระทบเซลล์ที่ติดกับแท่งแม่เหล็ก สำหรับหลอดควบคุม ดูดเลือดไปใส่หลอดใหม่ ตรวจนับค่าสัมบูรณ์เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์จากทั้งสองหลอดโดยใช้เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ และคำนวณค่าสัมบูรณ์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 โดยนำค่าสัมบูรณ์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์จากหลอดควบคุมลบด้วยค่าจากหลอดทดสอบ ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 ทั้งหมด 195 ตัวอย่าง เป็นเลือดคนปกติจำนวน 17 ราย และผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 178 ราย เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีมาตรฐานโฟลไซโทเมทรี จากผลการเปรียบเทียบโดยใช้สมการความถดถอยเส้นเชิงตรงและการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ พบว่าวิธีทั้งสองมีความสัมพันธ์กันโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.91 มีความลาดชันของเส้นถดถอย เท่ากับ 1 ระยะตัดแกน Y เท่ากับ -0.09 (Y= 0.98X-0.009) และ จากการทดสอบสถิติ Bland Altman พบว่ามีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของข้อมูลเท่ากับ 7 เซลล์ต่อไมโครลิตรเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน และ พบว่ามากกว่า 95% ของตัวอย่างอยู่ในช่วง 2SD วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไว 86% ความจำเพาะ 85% ความถูกต้อง 86% ค่าพยากรณ์บวกเท่ากับ 74% และ ค่าพยากรณ์ลบเท่ากับ 93% ที่จำนวนเซลล์ลิมโฟซัยท์ 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร และมีความไว 93% ความจำเพาะ 83% ความถูกต้อง 89% ค่าพยากรณ์บวกเท่ากับ 90% และค่าพยากรณ์ลบเท่ากับ 87% ที่จำนวนเซลล์ลิมโฟซัยท์ 350 เซลล์ต่อไมโครลิตร

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 ขึ้น ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ราคาถูก และใช้เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติซึ่งมีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลทั่วไป ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้ในการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยเอดส์ ในประเทศที่มีข้อจำกัดทางด้านเศรษฐกิจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved