

การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยวิธี OF/DCIP และการวัดความขุ่น

นัฐพล ประกอบแก้ว¹ ศิริพงษ์ อัครพันธ์¹ กุลนภา พุเจริญ^{2*} สุพรรณ พุเจริญ²
กนกวรรณ แสนไชยสุริยา² ณัฐยา แซ่อึ้ง²

บทคัดย่อ

การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่ดำเนินการในประเทศไทยปัจจุบันนิยมตรวจด้วยวิธี OF test และ DCIP test ซึ่งในการตรวจนั้น ต้องอ่านผลการตรวจด้วยตาเปล่า ในบางรายที่ให้ผลบวกไม่ชัดเจนอาจเป็นสาเหตุให้รายงานผลผิดพลาดได้ การศึกษานี้ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยชุดน้ำยาล้างรูป KKU-OFF และ KKU-DCIP-Clear โดยการวัดความขุ่นแทนการอ่านผลด้วยตาเปล่าที่มีความยาวคลื่นแสง 800 นาโนเมตร ซึ่งได้ค่า cut off สำหรับวิธี KKU-OFF และ KKU-DCIP Clear เท่ากับ 0.200 และ 0.090 ตามลำดับ เมื่อศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง 100 ราย เปรียบเทียบกับการอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน 83 ราย และเมื่อนำตัวอย่างทั้ง 100 รายมาตรวจยืนยันด้วยการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินและตรวจยีนอัลฟาธาลัสซีเมียสามารถจำแนกชนิดของธาลัสซีเมียได้ 11 ชนิด โดยมีอัตราการตรวจพบ อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 บีตาธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอี เท่ากับร้อยละ 2, 1 และ 37 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองพาหะทั้งสามชนิดนี้โดยวิธีวัดความขุ่นพบว่ามีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกและค่าการทำนายผลลบ ร้อยละ 100, 85.2, 81.2 และ 100 ตามลำดับ ส่วนการอ่านผลด้วยตาเปล่า มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกและค่าการทำนายผลลบ ร้อยละ 100, 77.1, 73.6 และ 100 ตามลำดับ ทั้งสองวิธีมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันแต่จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมจากการอ่านผลโดยวิธีวัดความขุ่นนั้นมีจำนวนน้อยกว่าการอ่านผลด้วยตาเปล่า ดังนั้นการตรวจคัดกรองด้วยวิธีวัดความขุ่น น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยให้ผลการตรวจมีความจำเพาะมากขึ้น ซึ่งจะลดค่าใช้จ่ายในการตรวจยืนยันและทำให้การดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียมีประสิทธิภาพมากขึ้น

คำสำคัญ: ธาลัสซีเมีย การตรวจคัดกรอง OF test DCIP test การวัดความขุ่น

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางกรรมพันธุ์ที่เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินทำให้สังเคราะห์โกลบินไม่ได้หรือได้ในปริมาณที่น้อยลง⁽¹⁾ ทำให้เม็ดเลือดแดงมีลักษณะผิดปกติและแตกง่าย ก่อให้เกิดอาการซีด เหลือง ตับม้ามโต ธาลัส

ซีเมียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีคนไทยเป็นพาหะของโรคเป็นจำนวนมาก และมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีอาการรุนแรงมากน้อยต่างกัน⁽²⁾ โดยชนิดรุนแรงที่กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยมีเป้าหมายในการควบคุมและป้องกันมี 3 โรค คือ Hb Bart's hydrops fetalis หรือ homozygous

¹ นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 ปีการศึกษา 2550

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Thalassemia screening using OF/DCIP tests and turbidimetric assay

Nattaphol Prakobkaew¹, Siripong Akkapin¹, Goonnapa Fucharoen^{2*}, Supan Fucharoen²,
Kanokwan Sanchaisuriya², Nattaya Sae-ung²

Abstract

In Thailand, screening for thalassemia and hemoglobinopathies relies on the use of combined OF and DCIP tests. These two tests are simple to perform and results can be interpreted by naked eyes. However, this can be difficult in some cases with suspicious result. In order to improve the effectiveness of the tests, study has been performed by using spectrophotometric measurement of the turbidity at 800 nm. The cut-off absorbance values were found to be 0.200 and 0.090 for the KCU-OF and the KCU-DCIP tests, respectively. Comparative study with naked eyes was carried out on 100 subjects. A concordant result between the two approaches was observed in 83 of 100 cases examined. Further Hb and DNA analyses of these samples identified 11 types of thalassemia including 2.0% α -thalassemia 1, 1.0% β -thalassemia and 37.0% Hb E. Based on this data, spectrophotometric method had the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 100, 85.2, 81.2, and 100%, respectively. The corresponding values for the conventional approach using naked eyes interpretation were 100%, 77.0%, 73.6 % and 100 %, respectively. Less false positive result was observed for the spectrophotometric method. This spectrophotometric interpretation is therefore an alternative method for improvement of screening specificity which should further facilitate the prevention and control program of thalassemia in Thailand.

Key words: Thalassemia, Screening, OF test, DCIP test, Turbidimetric assay

α - thalassemia 1 ซึ่งเป็นชนิดที่รุนแรงที่สุด ผู้ป่วยเสียชีวิตตั้งแต่ในครรภ์หรือทันทีหลังคลอด Homozygous β - thalassemia และ β - thalassemia / Hb E disease⁽³⁾ แนวทางที่ใช้ในการดำเนินงานเพื่อการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงทั้งสามชนิด คือ การตรวจคัดกรองเพื่อค้นหาผู้ที่เป็

คน โดยมีเป้าหมายสำคัญเพื่อค้นหาผู้ที่มึพาหะแฝงของ Hb E, α - thalassemia 1 และ β - thalassemia ซึ่งเป็นชนิดที่กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยดำเนินการควบคุมและป้องกัน เมื่อได้ผลบวกจากการตรวจคัดกรองแล้ว ตัวอย่างดังกล่าวจะได้รับการส่งต่อไปรับการตรวจยืนยันซ้ำด้วยการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน

¹ The 4th year Medical Technology Student, Faculty of Associated Medical Sciences,

² Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kean University

* Corresponding author (e-mail: goonnapa@kku.ac.th)

และดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานมีค่าใช้จ่ายสูงต่อไป^(4, 5) การตรวจคัดกรองเบื้องต้นเพื่อคัดเอาผู้ที่ไม่เสี่ยงต่อการเป็นพาหะทั้งสามชนิดซึ่งไม่จำเป็นต้องได้รับการตรวจยืนยันออกไป จะสามารถลดภาระค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานลงได้อย่างมากและเป็นแนวทางที่สามารถทำให้การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในประเทศไทยสามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในการตรวจคัดกรองและการตรวจยืนยันจะทำโดยวิธีใดนั้น ขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการและงบประมาณสนับสนุน การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยชุดน้ำยาลำเร็จรูป KKU-OF และ KKU-DCIP-clear^(6,7) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยเนื่องจากมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง สามารถทำการตรวจได้ในโรงพยาบาลชุมชนหรือสถานอนามัยที่มีความพร้อม และมีชุดน้ำยาลำเร็จรูปจัดจำหน่ายในท้องตลาด

อย่างไรก็ตามในการตรวจคัดกรองด้วยชุดน้ำยาลำเร็จรูป KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear นั้น ต้องอ่านผลการตรวจโดยดูจากความสูงของสารละลายด้วยตาเปล่าและอ่านผลเป็นบวกหรือลบ รายที่ให้ผลการตรวจเป็นบวก จะถูกส่งไปตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานต่อไป อย่างไรก็ตามในรายที่ให้ผลบวกไม่ชัดเจน ผู้ปฏิบัติจะขาดความมั่นใจในการอ่านผลและอ่านผลผิดพลาดได้ เนื่องจากการอ่านผลด้วยตาเปล่าขึ้นอยู่กับความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงานเป็นสำคัญ ดังนั้นหากมีวิธีการอื่นที่ช่วยให้ตัดสินใจได้ว่าควรอ่านผลเป็นบวกหรือลบที่แน่นอนขึ้นน่าจะช่วยให้การตรวจคัดกรองทำได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้สามารถลดภาระงานและค่าใช้จ่ายที่ต้องนำไปตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานและการตรวจดีเอ็นเอโดยไม่จำเป็นได้ การศึกษานี้จึงได้ศึกษาการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยชุดน้ำยาลำเร็จรูป KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear โดยการวัดความสูงด้วยเครื่อง spectrophotometer แทนการอ่านผลด้วยตาเปล่า เพื่อเป็นทางเลือกของการตรวจคัดกรองอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีการศึกษา

โครงการวิจัยนี้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE 500335) การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 กำหนดค่า cut-off ของการตรวจกรองด้วยวิธีวัดความสูงด้วยเครื่องเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-1201 Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 800 นาโนเมตร จากตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ของหน่วยบริการธาลัสซีเมีย สถานบริการเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น กลุ่มละไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

1. ตัวอย่างเลือดที่ให้ผลลบต่อการทดสอบ KKU-OF ด้วยตาเปล่า และไม่มียีน α -thalassemia 1 และ β -thalassemia
2. ตัวอย่างเลือดที่ให้ผลลบกับการทดสอบ KKU-DCIP-Clear ด้วยตาเปล่า และไม่มียีน Hb E
3. ตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ KKU-OF ด้วยตาเปล่าที่เป็นพาหะของ α -thalassemia 1 และ/หรือ β -thalassemia
4. ตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ KKU-DCIP-Clear ด้วยตาเปล่าและมี Hb E

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจกรอง α -thalassemia 1, β -thalassemia และ Hb E ด้วยการทดสอบ KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear โดยการอ่านผลด้วยตาเปล่าและการวัดความสูงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ค่า cut-off ที่หาได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยศึกษาในตัวอย่างเลือดที่เหลือของหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสที่มารับการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียที่หน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์จำนวน 100 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างได้รับการตรวจวัดพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Coulter Gen S) โดยมีรายละเอียดวิธีการศึกษา ดังนี้

1. การตรวจคัดกรอง

ทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียวด้วยชุดน้ำยาลำเร็จรูป KKU-OF และตก

ตะกอน Hb E โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KKU-DCIP-Clear⁽⁵⁻⁷⁾ ปฏิบัติตามมาตรฐานการปฏิบัติงานการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear⁽⁸⁾ โดยอ่านผลด้วยการสังเกตความขุ่นด้วยตาเปล่า และ วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 800 นาโนเมตรภายหลังที่ผสมเลือดกับน้ำยาแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่น้อยกว่า 30 นาที และผสมเลือดกับน้ำยาโดยการกลับลอดไปมาเบาๆอีกครั้งก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้น้ำกลั่นปรับศูนย์

2. การตรวจยืนยัน

ตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ HPLC (Variants™, β -Thal Short Program: Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) และตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR เพื่อค้นหายีน α - thalassemia 1 (SEA & THAI)⁽⁹⁾ α - thalassemia 2 (3.7 kb & 4.2 kb)⁽¹⁰⁾ และยีน Hb Constant Spring และยีน Hb Pakse⁽¹¹⁾

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

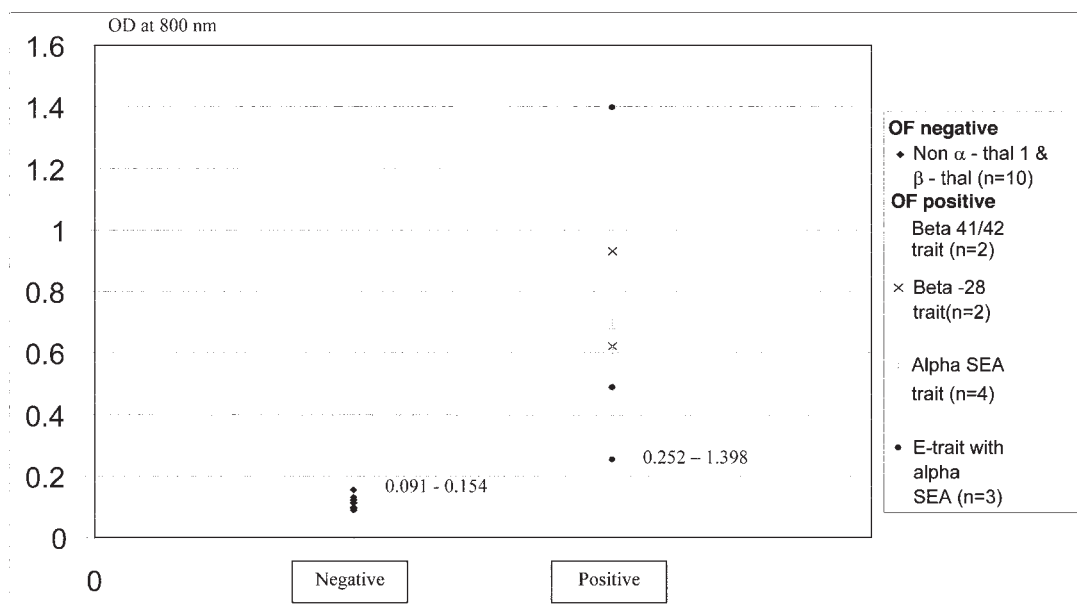
วิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองโดยคำนวณเป็น ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกและค่าการทำนายผลลบ เปรียบเทียบกับผลการตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐาน

ผลการศึกษา

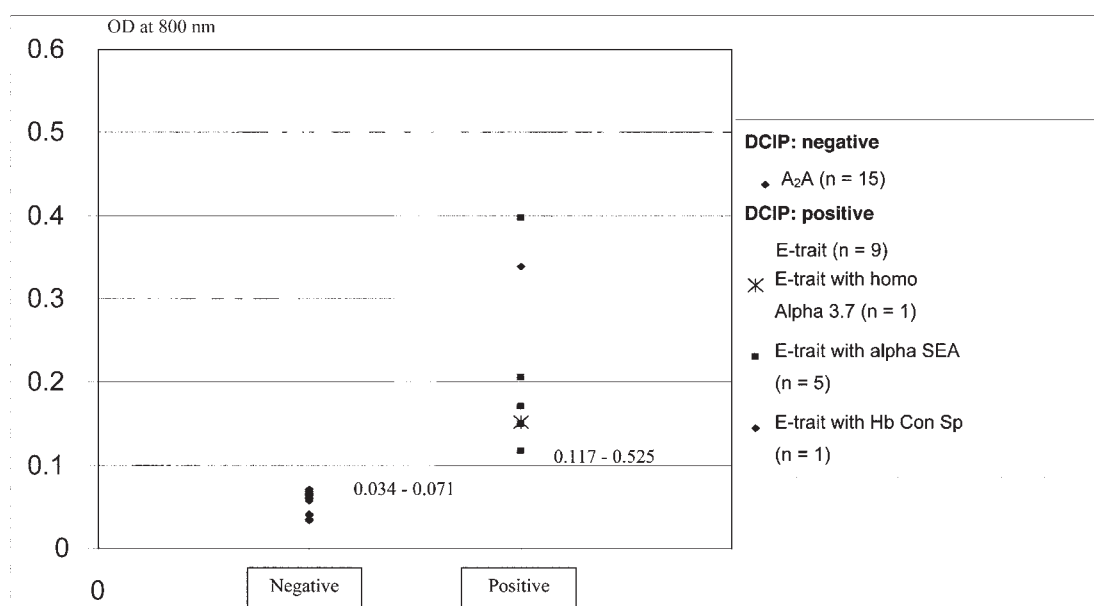
1. การกำหนดค่า cut-off ของการตรวจกรองด้วยการวัดความขุ่น

จากการศึกษาค่า cut-off ของการตรวจกรอง α - thalassemia 1, β - thalassemia และ Hb E ด้วยการทดสอบ OF/DCIP โดยการวัดความขุ่นพบว่า ในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อ KKU-OF ที่มีชนิดของ

ฮีโมโกลบินเป็น A_2A และไม่มียีน α - thalassemia 1 และ β - thalassemia จำนวน 10 ตัวอย่าง มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.154 ในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ KKU-OF ซึ่งเป็นพาหะ α - thalassemia 1 จำนวน 4 ตัวอย่าง พาหะ β - thalassemia จำนวน 4 ตัวอย่าง และพาหะ Hb E ที่มียีนแฝง α - thalassemia 1 จำนวน 3 ตัวอย่าง มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุดเท่ากับ 0.252 ดังนั้นจึงกำหนดค่า cut-off จาก (0.252 - 0.154) / 2 ได้ค่าเท่ากับ 0.049 แล้วจึงนำไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุดในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวก (0.252) ทำให้ได้ค่า cut-off สำหรับ KKU-OF เท่ากับ 0.200 ดังแสดงใน **รูปที่ 1** ส่วนค่า cut-off ของการทดสอบด้วย KKU-DCIP-Clear พบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลลบและไม่มี Hb E จำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.071 และในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกซึ่งเป็นพาหะ Hb E 9 ตัวอย่าง พาหะ Hb E ที่มียีนแฝง α - thalassemia 1 จำนวน 5 ตัวอย่าง พาหะ Hb E ร่วมกับ homozygous α - thalassemia 2 จำนวน 1 ตัวอย่าง และพาหะ Hb E ร่วมกับ Hb Constant Spring 1 ตัวอย่าง มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุดเท่ากับ 0.117 ผลที่ได้เมื่อนำไปกำหนดค่า cut-off ทำให้ได้ค่า cut-off สำหรับ KKU-DCIP เป็น 0.090 ดังแสดงใน **รูปที่ 2**



รูปที่ 1 แสดงค่า OD ที่ใช้ศึกษาค่า cut-off สำหรับการทดสอบด้วยน้ำยาสำเร็จรูป KKU-OF-Clear ในตัวอย่างชนิดต่างๆ



รูปที่ 2 แสดงค่า OD ที่ใช้ศึกษาค่า cut-off-Clear สำหรับการทดสอบด้วยน้ำยาสำเร็จรูป KKU-DCIP-Clear ในตัวอย่างชนิดต่างๆ

2. ผลการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจคัดกรองด้วยการอ่านผลด้วยตาเปล่าและการวัดความขุ่น

จากการตรวจคัดกรองด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear ในกลุ่มตัวอย่าง

จำนวนทั้งสิ้น 100 ราย โดยการอ่านผลการตรวจด้วยตาเปล่าและการวัดความขุ่น พบว่าการทดสอบด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KKU-OF โดยการอ่านผลด้วยตาเปล่า มีตัวอย่างที่ให้ผลบวก 21 ราย ผลบวกไม่ชัดเจน 17 ราย

และผลลบ 62 ราย ส่วนการอ่านผลด้วยการวัดความ
 ชุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าให้ผลบวก
 23 ราย ผลลบ 77 ราย ดังแสดงไว้ใน ตารางที่ 1 ก
 ส่วนการทดสอบด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KCU-DCIP-
 Clear โดยการอ่านผลด้วยตาเปล่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก

44 ราย ผลลบ 56 ราย ส่วนการอ่านผลด้วยวิธีการวัด
 ความชุ่นให้ผลบวก 42 ราย ผลลบ 58 ราย ดังแสดง
 ไว้ใน ตารางที่ 1 ข โดยรวมการอ่านผลทั้ง 2 วิธีให้ผล
 สอดคล้องกัน 83 ตัวอย่าง แตกต่างกัน 17 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ก เปรียบเทียบการอ่านผลการทดสอบ KCU-OF ด้วยตาเปล่ากับการวัดความชุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟ-
 โโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 800 นาโนเมตร

ตาเปล่า	การวัดความชุ่น ที่ 800 nm		รวม
	+	-	
+, (+/-)	23	15	38
-	0	62	62
รวม	23	77	100

ตารางที่ 1 ข เปรียบเทียบการอ่านผลการทดสอบ KCU-DCIP-Clear ด้วยตาเปล่ากับการวัดความชุ่นด้วยเครื่อง
 สเปคโตรโฟ-โตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 800 นาโนเมตร

ตาเปล่า	การวัดความชุ่น ที่ 800 nm		รวม
	+	-	
+	42	2	44
-	0	56	56
รวม	42	58	100

3. ผลการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียด้วยการตรวจ วิเคราะห์ฮีโมโกลบินและดีเอ็นเอ

จากการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง
 ตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ HPLC และการตรวจยีน
 α - thalassemia ที่พบป่วยในประเทศไทย พบธาลัสซีเมีย
 ทั้งสิ้น 11 จีโนไทป์ แต่ละจีโนไทป์มีข้อมูลทางโลหิต

วิทยาดังแสดงใน ตารางที่ 2 โดยมีตัวอย่าง 1 ราย
 ตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติที่ยังไม่ทราบชนิด เมื่อ
 พิจารณาเฉพาะชนิดที่เป็นเป้าหมายของการตรวจกรองคือ
 α - thalassemia 1, β - thalassemia และ Hb E
 ตรวจพบร้อยละ 2, 1 และ 37 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ชนิดของธาลัสซีเมียและข้อมูลทางโลหิตวิทยาที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาจำนวน 100 ราย ตัวเลขในตารางแสดง ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

type	No	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	RDW (%)	Hb typing	HbA ₂ /E (%)	Hb F (%)
Non thalassemia	47	4.4 $\pm$ 0.4	12.7 $\pm$ 0.9	38.1 $\pm$ 2.4	87.5 $\pm$ 4.3	29.3 $\pm$ 1.8	33.3 $\pm$ 1.0	13.7 $\pm$ 0.9	A ₂ A	2.8 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.4
Heterozygous β -thalassemia	1	5.2	10.1	31.3	60.2	19.4	32.2	15.4	A ₂ A	5.2	1.5
Heterozygous α -thalassemia 2 (3.7 kb deletion)	12	4.6 $\pm$ 0.6	12.2 $\pm$ 1.2	37.2 $\pm$ 3.5	81.1 $\pm$ 4.5	26.5 $\pm$ 1.2	32.7 $\pm$ 0.8	14.0 $\pm$ 0.5	A ₂ A	2.7 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.4
Compound heterozygous α -thalassemia 2/Hb CS	1	4.1	8.4	27.0	82.3	25.6	31.1	13.6	ConSpA ₂ A(Bart's)	3.5	3.1
Heterozygous α -thalassemia 1	1	4.3	8.3	27.3	55.4	16.8	30.4	22.6	A ₂ A	3.1	0.0
Heterozygous Hb E	24	4.7 $\pm$ 0.4	11.8 $\pm$ 1.1	35.6 $\pm$ 3.1	76.4 $\pm$ 2.9	25.3 $\pm$ 1.1	33.2 $\pm$ 0.8	14.6 $\pm$ 0.5	EA	30.0 $\pm$ 2.6	1.0 $\pm$ 0.6
Heterozygous Hb E with heterozygous α -thalassemia 2	5	4.5 $\pm$ 0.6	12.0 $\pm$ 1.2	35.2 $\pm$ 3.6	78.0 $\pm$ 2.6	26.7 $\pm$ 0.8	34.1 $\pm$ 0.4	14.9 $\pm$ 1.3	EA	27.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.6
Heterozygous Hb E with Hb CS	2	3.6, 4.2	10.5, 12.0	30.5, 35.3	83.6, 83.8	28.8, 28.5	34.8, 34.0	14.0, 13.9	EA	29.4, 30.5	1.2, 1.6
Heterozygous Hb E with compound α -thalassemia 2/Hb CS	1	4.9	10.8	33.8	68.8	22.0	32.0	17.4	Con Sp EA	23.1	2.4
Heterozygous Hb E with heterozygous α -thalassemia 1	1	6.0	11.8	34.8	58.3	10.0	33.9	19.1	EA	22.0	1.4
Homozygous Hb E	3	5.3 $\pm$ 1.4	11.6 $\pm$ 1.4	32.3 $\pm$ 2.7	56.9 $\pm$ 1.3	20.5 $\pm$ 0.5	36.0 $\pm$ 1.2	19.7 $\pm$ 2.0	EE	85.9 $\pm$ 4.2	6.2 $\pm$ 4.2
Homozygous Hb E with Hb Pakse'	1	5.1	10.6	33.5	66.0	21.0	31.7	15.0	EE	89.7	1.7
Unknown abnormal Hb	1	5.1	11.6	35.5	69.9	22.8	32.7	18.3	Abn Hb FA	12.2	5.6

4. ประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองด้วยการอ่านผลด้วยตาเปล่าและการวัดความขุ่น

จากข้อมูลผลการตรวจคัดกรองในตารางที่ 1 และผลการตรวจวินิจฉัยในตารางที่ 2 เมื่อนำไปประเมินประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองด้วยวิธีวัดความขุ่นพบว่าไม่มีตัวอย่างรายใดให้ผลลบปลอม โดยมีผลบวกปลอม 9 ตัวอย่าง คิดเป็นค่า ความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนาย

ผลบวกและค่าการทำนายผลลบ ร้อยละ 100, 85.2, 81.2 และ 100 ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 3 ส่วนการอ่านผลด้วยตาเปล่าพบว่าไม่มีตัวอย่างรายใดให้ผลลบปลอมเช่นกัน แต่มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมจำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นค่า ความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกและค่าการทำนายผลลบ ร้อยละ 100, 77.1, 73.6 และ 100 ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการตรวจคัดกรอง อัลฟาธาลัสซีเมีย 1, บีตาธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอี ด้วยการทดสอบ KKU-OF/KKU-DCIP-Clear โดยการวัดความขุ่น

KKU-OF/KKU-DCIP-Clear	Hb and DNA analysis for α - thalassemia 1, β -thalassemia and Hb E					Total
	Positive			Negative		
Positive	+ / -	2	39	4	9	48
	- / +	20		5		
	+ / +	17		0		
Negative	- / -	0		52		52
Total	39			61		100

$$\begin{aligned} \text{Sensitivity} &= (39/39) \times 100 = 100 \% \\ \text{Specificity} &= (52/61) \times 100 = 85.2 \% \\ \text{PPV} &= (39/48) \times 100 = 81.2 \% \\ \text{NPV} &= (52/52) \times 100 = 100 \% \end{aligned}$$

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการตรวจคัดกรอง อัลฟาธาลัสซีเมีย 1, บีตาธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอี ด้วยการทดสอบ KKU-OF/KKU-DCIP-Clear โดยการอ่านผลด้วยตาเปล่า

KKU-OF/KKU-DCIP clear	Hb typing and DNA analysis for α - thalassemia 1, β-thalassemia and Hb E					Total
	Positive			Negative		
Positive	+ / -	2	39	7	14	53
	- / +	12		4		
	+ / +	25		3		
Negative	- / -	0		47		47
Total	39			61		100

$$\begin{aligned} \text{Sensitivity} &= (39/39) \times 100 = 100 \% \\ \text{Specificity} &= (47/61) \times 100 = 77.1 \% \\ \text{PPV} &= (39/53) \times 100 = 73.6 \% \\ \text{NPV} &= (47/47) \times 100 = 100 \% \end{aligned}$$

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยน้ำยาลำเร็จรูป KKU-OF และ KKU-DCIP Clear โดยการวัดความขุ่นที่ 800 nm ในกลุ่มตัวอย่างที่ทราบจีโนไทป์ของธาลัสซีเมียเพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเกณฑ์ cut-off ในการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียได้ผลดังรูปที่ 1 และรูปที่ 2 ซึ่งได้ค่า cut off สำหรับน้ำยาลำเร็จรูป KKU-OF และ KKU-DCIP Clear เท่ากับ 0.200 และ 0.090 ตามลำดับ เมื่อนำค่า cut-off มาใช้ในการตรวจคัดกรองด้วยตัวอย่างจำนวน 100 ราย โดยเปรียบเทียบระหว่างการอ่านผลด้วยตาเปล่าและการอ่านผลด้วยการวัดความขุ่นที่ 800 nm พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน 83 ราย ไม่สอดคล้องกัน 17 ราย (ตารางที่ 1) โดยผลที่ไม่สอดคล้องกันนั้นส่วนใหญ่ (15 ราย) เกิดจากการทดสอบด้วย KKU-OF โดยพบว่าการอ่านผลด้วยตาเปล่าให้ผลเป็นบวกไม่ชัดเจน (+/-) แต่เมื่อวัดความขุ่นแล้วให้ผลเป็นลบโดยมีค่า OD อยู่ในช่วง 0.1- 0.2 ซึ่งในจำนวนนี้ 5 ราย เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี และมีอีก 2 ราย ที่ให้ผลการทดสอบด้วย KKU-OF เป็น (+/-) แต่เมื่อวัดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ซึ่งทั้ง 2 รายก็เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าพาหะฮีโมโกลบินอีเป็นตัวแปรสำคัญที่ทำให้การอ่านผลการตรวจคัดกรองด้วย KKU-OF ด้วยการวัดความขุ่นและตาเปล่าให้ผลไม่ตรงกัน ส่วนการทดสอบด้วย KKU-DCIP-Clear พบว่าให้ผลไม่ตรงกันเพียง 2 ราย โดยให้ผลการอ่านด้วยตาเปล่าเป็นบวกแต่ด้วยวิธีวัดความขุ่นให้ผลเป็นลบ ทั้ง 2 รายมีค่า OD 0.084 และ 0.088 ซึ่งสูงใกล้เคียงกับค่า cut-off (0.09) โดยตัวอย่าง 2 รายนี้มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น A_2A จึงถือเป็นผลบวกปลอมของการอ่านผล KKU-DCIP-Clear ด้วยตาเปล่า

ตัวอย่างทั้ง 100 รายเมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินและผลการตรวจยีนอัลฟาธาลัสซีเมียมาแปลผลร่วมกันสามารถจำแนกชนิดของธาลัสซีเมียได้ทั้งสิ้น 11 ชนิดแต่ละชนิดมีข้อมูลทางโลหิตวิทยาและอัตราการตรวจพบคล้ายคลึงกับที่เคยมีรายงานไว้แล้ว^(6,7) จากตารางที่ 3 เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรวจ

คัดกรองอัลฟาธาลัสซีเมีย 1, บีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีด้วยการทดสอบ KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear โดยวิธีวัดความขุ่นพบว่า ตัวอย่างจำนวน 39 รายถูกอ่านเป็นผลบวกและมียีนธาลัสซีเมีย (อัลฟาธาลัสซีเมีย 1, บีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี อย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกัน) ไม่พบผลลบปลอม ความไวและค่าการทำนายผลลบจึงเท่ากับร้อยละ 100 และตัวอย่างจำนวน 52 รายถูกอ่านเป็นผลลบและไม่มียีนธาลัสซีเมีย โดยมีผลบวกปลอม 9 ราย [จาก KKU-OF (+) / KKU-DCIP-Clear (-) 4 ราย และ KKU-OF (-) / KKU-DCIP-Clear (+) 5 ราย] ทำให้มีความจำเพาะเป็นร้อยละ 85.2 และค่าทำนายผลบวกร้อยละ 81.2

จากตารางที่ 4 เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองอัลฟาธาลัสซีเมีย 1, บีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีด้วยการทดสอบ KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear ด้วยตาเปล่า พบว่าตัวอย่างจำนวน 39 รายถูกอ่านเป็นผลบวกและมียีนธาลัสซีเมีย ไม่พบผลลบปลอม ความไวและค่าการทำนายผลลบจึงเท่ากับร้อยละ 100 ตัวอย่างจำนวน 47 รายถูกอ่านเป็นผลลบและไม่มียีนธาลัสซีเมีย โดยมีผลบวกปลอม 14 ราย [จาก KKU-OF (+) / KKU-DCIP-Clear (-) 7 ราย, KKU-OF (-) / KKU-DCIP-Clear (+) 4 ราย และ KKU-OF (+) / KKU-DCIP-Clear (+) 3 ราย] ทำให้มีความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 77.1 และค่าทำนายผลบวกเท่ากับร้อยละ 73.6 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองระหว่างการอ่านผลด้วยการวัดความขุ่นและตาเปล่าจะพบว่าประสิทธิภาพใกล้เคียงกันแต่จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมที่เกิดการอ่านผลโดยวิธีวัดความขุ่นนั้นมีจำนวนน้อยกว่าการอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยที่การอ่านผลการทดสอบด้วยวิธีทั้งสองไม่มีตัวอย่างใดที่ให้ผลลบปลอมเหมือนกัน

โดยสรุปประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองอัลฟาธาลัสซีเมีย 1, บีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีด้วยวิธีวัดความขุ่นที่ 800 นาโนเมตร โดยใช้ค่า cut-off ที่ 0.200 สำหรับการทดสอบด้วยน้ำยา KKU-OF และ cut-off ที่ 0.090 สำหรับการทดสอบด้วยน้ำยา KKU-DCIP-Clear

นั้นมีความไวเท่ากับการอ่านผลการทดสอบด้วยตาเปล่า คือ ร้อยละ 100 เนื่องจากไม่มีผลลบปลอมเหมือนกัน แต่มีความจำเพาะที่สูงกว่า เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมน้อยกว่าการอ่านผลด้วยตาเปล่าทั้งจากการทดสอบด้วย KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear โดยผลบวกปลอมที่เกิดขึ้นเหมือนกันจากการอ่านผลการทดสอบโดยวิธีวัดความขุ่นและตาเปล่า นั้นในกลุ่ม KKU-OF (+) , KKU-DCIP-Clear (-) เกิดจากการที่มีฮีโมโกลบินอี 2 ราย ซึ่งเมื่อตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอพบเป็น heterozygous α -thalassemia 2 และ compound heterozygous α -thalassemia 2 / Hb CS ตามลำดับ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมรายอื่นตรวจไม่พบฮีโมโกลบินอีและฮีโมโกลบินอี สาเหตุจึงน่าจะมาจากความผิดปกติของตัวอย่างเลือดเอง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมเหล่านี้จะถูกส่งตรวจยืนยันต่อไป ในการตรวจคัดกรองด้วย KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear โดยวิธีการวัดความขุ่นและการอ่านผลด้วยตาเปล่านี้ไม่มีตัวอย่างใดที่ให้ผลลบปลอม ดังนั้นการตรวจคัดกรองอัลฟาธาลัสซีเมีย 1, บีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีด้วยวิธีวัดความขุ่น จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจคัดกรองเพื่อช่วยในการตัดสินใจในการอ่านผลในกรณีที่ผลการอ่านความขุ่นด้วยตาเปล่าไม่ชัดเจนและช่วยทำให้การตรวจคัดกรองนั้นมีความจำเพาะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะลดค่าใช้จ่ายที่ต้องในการตรวจยืนยันตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมเหล่านี้ลงได้จำนวนหนึ่ง เช่น จากการศึกษานี้สามารถลดการเกิดผลบวกปลอมจาก 14 รายจากการอ่านผลด้วยตาเปล่า เหลือเพียง 9 ราย อย่างไรก็ตามการวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์อาจมีขั้นตอนที่ยุ่งยากมากขึ้นและไม่สะดวกในทางปฏิบัติและห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่อาจไม่มีเครื่องมือ ดังนั้นหากสามารถจัดหาหรือพัฒนาเครื่องมือวัดความขุ่นขนาดพกพาที่สะดวกใช้และไม่ยุ่งยากในการใช้งาน มาใช้ควบคู่กับน้ำยาสำเร็จรูป KKU-OF และ KKU-DCIP-Clear น่าจะทำให้การตรวจคัดกรองมีประสิทธิภาพและสามารถให้บริการได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndrome. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1981 :19-48.
2. กิตติ ต่อจรัส และคณะ. โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย. ใน: ธานินทร์ อินทรกำรชัย, (บรรณาธิการ), แนวทางการรักษาโรคโลหิตวิทยาในประเทศไทย, 2543 : 27-38.
3. Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia in Southeast Asia: problem and strategy for prevention and control. Southeast Asia J Trop Med Public Health 1992; 23: 647-55.
4. สุพรรณ พุทธิเจริญ, กุลนภา พุทธิเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียตามแผนการควบคุมและป้องกันโรคของประเทศไทย. สงขลานครินทร์เวชสาร 2545; 20: 43-55.
5. กุลนภา พุทธิเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย. ขอนแก่น 2549: 41-107.
6. Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Sae-ung N, Dangwibul S, Fucharoen S. A simplified screening strategy for Thalassemia and hemoglobin E in rural communities of Southeast Asia. Bull World Health Organ 2004; 82: 364-72
7. Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Fucharoen G, et al. A reliable screening protocol for thalassemia and hemoglobinopathies in pregnancy: and alternative approach to electronic blood cell counting. Am J Clin Pathol 2005; 123: 113-8.
8. สาคร วันทอง, กุลนภา พุทธิเจริญ, เชี่ยวชาญ สระคูพันธ์, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, ณัฐยา แซ่ฮึ้ง, สุพรรณ พุทธิเจริญ. การจัดตั้งระบบควบคุมคุณภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียที่โรงพยาบาลเมืองสรวงจังหวัดร้อยเอ็ด. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2550; 19: 148-66.

9. Sae-ung N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Alpha⁰-thalassemia and related disorders in northeast Thailand: a molecular and hematological characterization. *Acta Haematol* 2007;117: 78-82.
10. Fucharoen S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Pengiam Y. Molecular analysis of a Thai β - thalassemia heterozygote with normal hemoglobin A₂ level : implication for population screening. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 44-9.
11. Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Panyasai S, Devenish R, Luy L. Interaction of hemoglobin E with several forms of α - thalassemia in Cambodian families. *Haematologica* 2003; 88: 1092-8.