

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเบื้องต้นของความคงตัวของตัวอย่างเลือดต่อการทดสอบ ความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเลือดเดียวเพื่อการคัดกรอง พาหะธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

สิทธิชัย ปัญญาใส^{1*}, รุฮานี สานิง², ลัดดาวรรณ หนูเกลี้ยง², ฮัฟเซาะ บูเดียะ²

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาความคงตัวของตัวอย่างเลือดที่นำมาทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเลือดเดียว เพื่อตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง โดยศึกษาเกี่ยวกับตัวอย่างเลือดที่ใช้ฮีติทีเอเป็นสารกันเลือดแข็งจำนวน 114 ตัวอย่าง แบ่งเป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมีย, อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด เอสอีเอตีลีซัน, ฮีโมโกลบินอี, ฮีโมโกลบินอีไฮโมไซโกต, ฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง และ ปกติ จำนวน 8, 2, 19, 1, 1 และ 83 ตัวอย่างตามลำดับ จัดเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมดไว้ที่ 4 °C ตลอดการทดสอบ ทำการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเลือดเดียวด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KGU-OF ในเวลาต่างๆ ดังนี้ 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ อ่านผลการทดสอบด้วยตาเปล่า โดยผลบวกสารละลายขุ่นและผลลบสารละลายใส ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างเลือดของพาหะบีตาธาลัสซีเมีย, อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด เอสอีเอตีลีซัน และ ไฮโมไซโกตฮีโมโกลบินอี มีความคงตัวต่อการทดสอบที่ 36, 32 และมากกว่า 120 ชั่วโมง ตามลำดับพาหะฮีโมโกลบินอีมีความคงตัวต่อการทดสอบที่ 16 ชั่วโมง ส่วนพาหะฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง และคนปกติ ให้ผลลบต่อการทดสอบตั้งแต่ที่ 0 ชั่วโมง การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเลือดเดียวสามารถคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้ 2 ชนิดคือ พาหะบีตาธาลัสซีเมียและอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิดเอสอีเอตีลีซัน ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่สามารถคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดอื่นได้ และความถูกต้องของการคัดกรองขึ้นอยู่กับอายุการเก็บตัวอย่างเลือด ควรทำการทดสอบภายใน 32 ชั่วโมงหลังจากเจาะเก็บเลือด จึงจะได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องร้อยละ 100 วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2551; 41: 94-102.

คำรหัส การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเลือดเดียว, บีตาธาลัสซีเมีย, อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด เอสอีเอตีลีซัน, พาหะ, ฮีโมโกลบินอี

^{1*} แขนงวิชาโลหิตวิทยาและจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา

² นักศึกษาชั้นปีที่ 4 สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อ.ท่าศาลา นครศรีธรรมราช

Abstract : Preliminary study of stability of blood used in the one tube osmotic fragility test to screen severe thalassemia carriersSittichai Panyasai^{1*}, Ruhanee Saning², Laddawan Nooklieng², Hafsoh Budiah²

At present, one-tube osmotic fragility test (OFT) is used to screen severe thalassemia carriers. This study was aimed to study of stability of blood used in the osmotic fragility test (OFT). One hundred and fourteen EDTA blood samples were recruited, comprising 8 β -thalassemia carriers, 2 α -thalassemia 1 (SEA deletion) carriers, 19 hemoglobin E carriers (Hb E), 1 homozygous HbE (Hb EE), 1 hemoglobin constant spring (HbCS) carrier and 83 normal. Blood samples were stored at 4 °C throughout the study. All blood samples were tested for OFT at 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 72, 96 and 120 hours, respectively, by using the KKU-OF test. The results showed that the stability of blood samples from β -thalassemia, α -thalassemia 1 (SEA deletion) and homozygous HbE was 36, 32 and up to 120 hours, respectively, whereas that of Hb E heterozygote was 16 hours. The remaining groups were negative at 0 hour and remained negative throughout the study. This study suggested that one-tube OF test (OFT) can be used to screen two types of severe thalassemia carriers (β -thalassemia, α -thalassemia 1) effectively but it is not applicable for HbE heterozygote and Hb CS screening. The screening accuracy depended on preservation period of blood samples. To obtain maximal accuracy, the blood samples should be tested within 32 hours after collection. The knowledge generated from the present report would be great benefit for the national thalassemia prevention and control program. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2008; 41: 94-102.

Keywords: One tube osmotic fragility test, β -thalassemia, α -thalassemia 1 (SEA deletion) Carrier, Hemoglobin E,

^{1*} Division of Hematology and Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Naresuan University Phayao

² Fourth-Year Student, School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Thasala District, Nakhonsithammarat

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบิน ทำให้สร้างได้น้อยลงหรือสร้างไม่ได้เลย เป็นโรคผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทย และไม่เพียงแต่จะก่อให้เกิดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศยังเป็น

ปัญหาทางเศรษฐกิจอีกด้วย¹ โดยพบว่าประชากรไทยประมาณร้อยละ 30-40 หรือประมาณ 18-24 ล้านคนมียีนทางพันธุกรรมที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ และมีผู้ที่ป่วยเป็นโรคประมาณร้อยละ 1 ของประชากรหรือประมาณ 6 แสนคน² แนวทางการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย มุ่งที่จะ

ลดจำนวนผู้ป่วยเกิดใหม่ที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย ชนิดรุนแรง 3 ชนิดคือ Hb Bart's hydrops fetalis, b-thalassemia disease และ b-thalassemia/HbE disease³ โดยการตรวจคัดกรองหาผู้เป็นพาหะธาลัสซีเมียที่นำไปสู่การเกิดโรคที่รุนแรงได้คือ พาหะ b-thalassemia, พาหะ a-thalassemia 1 และ HbE (ทั้ง heterozygote และ homozygote) การตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียเหล่านี้ ตามแนวทางสากลมักนิยมใช้การตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติร่วมกับการตรวจอย่างอื่นด้วยวิธีมาตรฐาน ซึ่งพาหะธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง เช่น a-thalassemia 1 หรือ b-thalassemia จะมีค่า Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) ลดลงเมื่อเทียบกับคนปกติ⁴ มีรายงานประสิทธิภาพของค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงในการคัดกรองพาหะ a-thalassemia 1 และ b-thalassemia โดยพบว่ามีความไวสูงถึงร้อยละ 92.9 ความจำเพาะร้อยละ 83.9 ค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 37.9 และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 99.1⁵ อย่างไรก็ตามแนวทางดังกล่าวมีข้อจำกัดและยังไม่ถูกนำมาใช้ในวงกว้างเนื่องจากเครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติมีราคาแพงและมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสูง นอกจากนี้ต้องมีการควบคุมคุณภาพของเครื่องให้ที่อยู่เสมอค่าที่ได้ถึงจะน่าเชื่อถือ การประยุกต์ใช้แนวทางดังกล่าวจึงไม่เป็นทางเลือกที่ดีนัก โดยเฉพาะในประเทศที่ยังขาดเครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติ บางประเทศในแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทยได้นำการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียว one-tube osmotic fragility test (OFT) มาใช้ในการตรวจคัดกรองแทนแนวทางสากลดังกล่าว^{6,7} ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายเกือบจะทุกพื้นที่ของประเทศ และปัจจุบันได้มีการผลิตน้ำยาในรูปชุดน้ำยาสำเร็จรูปออกจำหน่าย และมีราคาถูกกว่าการตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ และให้ผลครอบคลุมพาหะธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่จะก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้⁸ ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าแนวทางดังกล่าวมีประสิทธิภาพดี โดยมีค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าการทำนายผลบวก และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 100,

87.1, 84.5 และ 100 ตามลำดับ⁹ ดังนั้นวิธีการทดสอบดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกในการคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่จะก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้ โดยเฉพาะในโรงพยาบาลขนาดเล็กที่ขาดเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ นอกจากนี้วิธีการทดสอบดังกล่าวสามารถทำได้ง่ายและอ่านผลได้ภายใน 15 นาที ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพง อีกทั้งผู้ทดสอบไม่จำเป็นต้องมีความชำนาญมากนัก แต่อย่างไรก็ตามการนำวิธีทดสอบดังกล่าวไปใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จริง พบว่ามีค่าความไว และค่าการทำนายผลลบลดลง⁸ แสดงให้เห็นถึงการมีปัจจัยหรือข้อจำกัดในการทดสอบอย่างอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งถ้าพิจารณาจากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจริงแล้ว มักพบว่าตัวอย่างเลือดที่นำมาทดสอบเป็นปัจจัยที่สำคัญคือโรงพยาบาลส่วนใหญ่โดยเฉพาะโรงพยาบาลขนาดเล็กมักจะมีการเก็บตัวอย่างเลือดไว้หลายวันก่อนนำมาทำการทดสอบ อาจเนื่องจากการต้องการความประหยัดและลดภาระงานที่จะต้องทำการทดสอบทุกวัน หรือความไม่คุ้มทุนในการตรวจหนึ่งครั้งที่มีจำนวนตัวอย่างน้อย ดังนั้นการศึกษาความคงตัวของตัวอย่างเลือดที่ใช้การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียวเพื่อคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพการตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และเป็นแนวทางในการแนะนำผู้ปฏิบัติงานให้สามารถเลือกใช้ตัวอย่างเลือดที่นำมาทดสอบได้อย่างถูกต้อง ซึ่งจะส่งผลให้การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยประสบผลสำเร็จสูงสุด

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเลือด

ใช้ตัวอย่างเลือดรวมที่มีฮีโมโกลบินเป็นสารกันเลือดแข็ง ปริมาตร 3 ml. จากนักศึกษามหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จำนวน 114 ตัวอย่าง เป็นเพศชาย 27 ราย เพศหญิง 87 ราย ทุกรายเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจและลงนามในใบยินยอม (informed consent form) ตัวอย่างทุกรายถูกนำมาตรวจทางโลหิตวิทยาและดัชนีเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (NIKON

KOHDEN, Tokyo, Japan)

การทดสอบความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียว (one tube osmotic fragility test (OFT))

ทำการทดสอบความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียวด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KCU-OF โดยทำการทดสอบในทุกตัวอย่าง (114 ราย) ทันทีที่ทำการเจาะเก็บเลือด (0 ชั่วโมง) จากนั้นแบ่งตัวอย่างใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml หลอดละ 50 ไมโครลิตรเป็นจำนวน 14 หลอดในทุกๆ ตัวอย่าง และเก็บไว้ที่ 4 °C ตลอดการทดสอบ และนำออกมาทดสอบความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงดังนี้ที่ 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ มีวิธีการและหลักการของการทดสอบคือ ใช้เลือดรวม (whole blood) 15 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยาปริมาตร 2 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที อ่านผลการทดสอบด้วยตาเปล่า โดยมีหลักการแปลผลดังนี้ เม็ดเลือดแดงคนปกติเมื่ออยู่ในน้ำยาทดสอบจะแตกได้หมด (complete hemolysis) ภายในเวลา 15 นาที ทำให้สารละลายใส อ่านผลได้เป็นลบ (negative) แต่เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียและผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมียบางชนิดจะแตกไม่หมด มีเซลล์เหลืออยู่ ทำให้สารละลายขุ่น อ่านผลเป็นบวก (positive)¹⁰

การตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

ตัวอย่างทุกรายถูกนำมาตรวจหาปริมาณฮีโมโกลบินเอสสอง เพื่อวินิจฉัยพาหะบีตาธาลัสซีเมียด้วยวิธี KCU - minicolumn chromatography¹¹ โดยตัวอย่างที่มีปริมาณฮีโมโกลบินเอสสองมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 4-10 จะถูกวินิจฉัยเป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมีย⁶ และแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis ในสภาวะต่าง¹²

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตรวจวินิจฉัย α -thalassemia 1 ชนิด SEA deletion และ THAI deletion โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จาก

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีมาตรฐาน¹³⁻¹⁵

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงประกอบด้วย Rbc, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV โดยใช้สถิติพรรณนา (ค่าเฉลี่ย, ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดยใช้ The Mann-Whitney U Test

ผลการศึกษา

จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาศึกษา 114 ตัวอย่าง มีอายุตั้งแต่ 19-21 ปี เป็นเพศชาย 27 ราย เพศหญิง 87 ราย จากการตรวจทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงพบว่า ในเพศชายไม่มีภาวะซีด ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก¹⁶ ซึ่งทุกรายมีค่าฮีโมโกลบินมากกว่า 13 g/dl (15.07 ± 0.8 g/dl) และพบเพศหญิงจำนวน 21 รายที่มีค่าฮีโมโกลบินน้อยกว่า 12 g/dl (12.50 ± 1.0 g/dl) ผลการตรวจพาหะธาลัสซีเมียพบพาหะ β -thalassemia 8 ราย, พาหะ α -thalassemia 1 ชนิด SEA deletion 2 ราย, HbE 19 ราย, HbEE 1 ราย, HbCS 1 ราย และไม่พบยีนธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 83 ราย ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงของพาหะธาลัสซีเมียแต่ละชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียวพบว่าให้ผลบวกจำนวน 25 ราย (positive OFT) และผลลบจำนวน 89 ราย (negative OFT) ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มแสดงไว้ในตารางที่ 1

ผลการศึกษาความคงตัวของตัวอย่างเลือดพบว่าในชั่วโมงที่ 0 (หลังจากเจาะเก็บเลือด) ให้ผลบวก 25 ราย ในจำนวนนี้เป็นพาหะ α -thalassemia 1 จำนวน 2 ราย, พาหะ β -thalassemia 8 ราย, พาหะฮีโมโกลบินอี (HbE) 12 ราย, โฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี (HbEE) 1 ราย, และคนปกติ 2 ราย ให้ผลลบ 89 ราย เป็นพาหะ HbE 7 ราย, พาหะฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง (HbCS) 1 ราย

และคนปกติ 81 ราย เมื่อคำนวณประสิทธิภาพของ OFT พบว่ามีความไวต่อการคัดกรองพาหะ α -thalassemia 1, พาหะ β -thalassemia และ HbEE ได้เท่ากับร้อยละ 100 แต่มีประสิทธิภาพในการคัดกรองพาหะ HbE ร้อยละ 63 และไม่สามารถคัดกรองพาหะ HbCS ได้ ความคงตัวของตัวอย่างเลือดแยกตามชนิดของพาหะ ธาลัสซีเมียพบว่า พาหะ β -thalassemia และ พาหะ α -thalassemia 1 มีความคงตัวสูงสุดต่อการทดสอบที่ 36 และ 32 ชั่วโมง ตามลำดับ, HbEE มีความคงตัวสูงสุดต่อการทดสอบมากกว่า 120 ชั่วโมง, พาหะ HbE มีความคงตัวสูงสุดต่อการทดสอบที่ 16 ชั่วโมง ดังแสดงในตาราง

ที่ 3

การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าทางโลหิตวิทยาและดัชนีเม็ดเลือดแดงระหว่างกลุ่ม positive OFT และ negative OFT พบว่า ระดับ Hb และ Hct ไม่แตกต่างกัน ($p = 0.056, 0.373$ ตามลำดับ) ในขณะที่ค่า Rbc, MCV, MCH, MCHC และ RDW-CV แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยค่า Rbc และ RDW-CV ในกลุ่มที่ให้ผลบวกมีค่าที่สูงกว่ากลุ่มที่ให้ผลลบ ค่า MCV, MCH, MCHC ในกลุ่มที่ให้ผลบวกมีค่าที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ให้ผลลบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในตัวอย่าง 114 ราย โดยแยกเป็นกลุ่มที่ให้ผลบวกและลบต่อการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียว เปรียบเทียบโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U Test

Hematologic parameters	One tube Osmotic Fragility test (114)		<i>p</i> - value
	Positive (25)	Negative (89)	
Rbc ($\times 10^6$ cells/ μ l)	5.3 \pm 1.0	4.8 \pm 0.5	< 0.001
Hb (g/dl)	12.8 \pm 1.8	13.2 \pm 1.3	0.056
Hct (%)	41.6 \pm 5.5	41.8 \pm 4.1	0.373
MCV (fl)	77.1 \pm 8.0	86.7 \pm 8.0	< 0.001
MCH (pg)	23.8 \pm 2.9	27.6 \pm 2.0	< 0.001
MCHC (g/dl)	30.8 \pm 1.1	31.6 \pm 0.9	< 0.001
RDW-CV (%)	12.6 \pm 1.9	11.4 \pm 0.8	< 0.001

ตารางที่ 2 ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในพาหะธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ

Thalassemia types	Hematologic Parameters						
	Rbc ($\times 10^6 / \mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	RDW-CV (%)
Heterozygous α -thalassemia (8)	5.7 \pm 0.8	12.2 \pm 1.6	40.3 \pm 4.8	70.8 \pm 6.8	21.4 \pm 2.5	30.2 \pm 0.9	13.0 \pm 0.8
Heterozygous β -thalassemia 1 (2)	5.53, 6.74	11.8, 14.3	39, 47.8	70.5, 70.9	21.3, 21.2	30.3, 29.9	12.6, 12.3
Heterozygous HbE (19)	5.0 \pm 1.0	12.9 \pm 1.8	41.4 + 5.8	81.0 \pm 3.2	25.3 \pm 1.1	31.2 \pm 1.0	11.8 \pm 0.6
Homozygous HbE (1)	6.5	11.8	39.2	60.3	18.2	30.1	20.6
Heterozygous HbCS (1)	5.84	14.7	46.9	80.3	25.2	31.3	11.0
Normal (83)	4.8 \pm 0.5	13.2 \pm 1.3	42.0 \pm 4.1	87.1 \pm 8.3	27.8 \pm 2.1	31.6 \pm 0.9	11.4 \pm 0.8

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเลือดเดียวในพาหะธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ เมื่อเก็บเลือดไว้ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Thalassemia	Storage Time (hours)														
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	48	72	96	120
Heterozygous α -thalassemia (8)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6	6	3	0	0
Heterozygous β -thalassemia 1 (2)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0
Heterozygous HbE (19)	12	12	12	12	12	11	11	9	9	6	6	6	4	4	4
Homozygous HbEE (1)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Heterozygous HbCS (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal (83)	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

วิจารณ์ผลการศึกษา

ธาลัสซีเมียเป็นโรคผิดปกติทางพันธุกรรมที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญยิ่งของหลายประเทศ และนอกจากนี้ยังเป็นปัญหาเศรษฐกิจที่สำคัญอีกด้วย ระบาดวิทยาของโรคพบได้ทั่วทุกภูมิภาคของโลก จนปัจจุบัน

กลายเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของทั่วโลกที่ต้องได้รับการแก้ไข^{17,18} ในหลายประเทศที่มีความชุกของโรคและพาหะสูง เช่น ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยได้กำหนดแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรค เพื่อมุ่งลดจำนวนผู้ป่วยเด็ก

เกิดใหม่ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงให้ได้มากที่สุด ความสำเร็จของแนวทางดังกล่าวมีขั้นตอนที่สำคัญที่สุดอยู่ที่การตรวจเลือดเพื่อค้นหาผู้เป็นพาหะ เนื่องจากผู้เป็นพาหะของโรคจะไม่แสดงอาการทางคลินิกแต่อย่างใด มีสุขภาพดีเหมือนคนปกติทั่วไป แต่สามารถที่จะถ่ายทอดยีนธาลัสซีเมียไปสู่ลูกหลานได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการและแนวทางในการตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะชนิดที่ทำให้เกิดโรคที่มีอาการรุนแรง ตามแนวทางการตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียของประเทศไทย ปัจจุบัน ดำเนินการได้ใน 2 แนวทาง คือ การตรวจด้วย one-tube OF test (OFT) และ DCIP test ควบคู่กัน หรือการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติเพื่อวัดค่า MCV, MCH และ DCIP test คู่กัน โดยถือเกณฑ์ $MCV < 80$ fl และ/หรือ $MCH < 27$ pg ให้สงสัยว่าผิดปกติ โดยแนวทางแรกเป็นแนวทางที่เหมาะสมสำหรับตรวจกรองในระดับชุมชนที่มีจำนวนตัวอย่างมาก^{6,9} มีรายงานการวิจัยที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการทดสอบ OFT ในการคัดกรองพาหะ β -thalassemia ซึ่งมีความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกและค่าการทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 100, 83.7, 10.5 และ 100 ตามลำดับ¹⁹ นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ OFT กับ ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงที่ได้จากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติในการคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง โดยพบว่า OFT มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกและค่าการทำนายผลลบ ที่ดีกว่า ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (ร้อยละ 100, 87.1, 84.5 และ 100 ตามลำดับ)⁹ ในขณะที่ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงมีความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกและค่าการทำนายผลลบ ร้อยละ 81.7, 77.0, 71.5 และ 85.6 ตามลำดับ สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานมาก่อน^{5,20} อย่างไรก็ตามการตรวจคัดกรองด้วย OFT ยังเกิดผลบวกวงได้บ้าง (false positive OFT) เนื่องจากเม็ดเลือดแดงชนิดดิดสีจาง (hypochromia) และพาหะธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรงบางชนิดให้ผลบวกวงได้ (physiological false positive) เช่น α -thalassemia 2 หรือ ฮีโมโกลบินผิดปกติบางชนิด เช่น HbCS, Hb Paksé' (Hb PS) เป็นต้น¹⁰ ส่งผลให้ค่าความจำเพาะของการทดสอบไม่ถึงร้อยละ 100 นอกจากนี้การทดสอบ OFT ในระดับของผู้ปฏิบัติงานจริงในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ พบว่ามีประสิทธิภาพ

ในการคัดกรองน้อยกว่าที่กล่าวมา คือมักพบผลลบวง (false negative) ในการทดสอบเป็นจำนวนมาก ซึ่งส่งผลต่อความสำเร็จของการดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคของประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง สาเหตุของความผิดพลาดดังกล่าว ส่วนหนึ่งมาจากการขาดความเข้าใจในข้อจำกัดของวิธีการทดสอบของผู้ปฏิบัติงาน รวมทั้งยังไม่เคยมีการศึกษาข้อจำกัดของวิธีการทดสอบ เช่น ความคงตัวของตัวอย่างเลือดที่จะนำมาใช้ทดสอบ เป็นต้น ดังนั้นข้อมูลจากการศึกษานี้จะช่วยแก้ปัญหาข้อผิดพลาดดังกล่าวได้ โดยพบว่า OFT มีประสิทธิภาพในการคัดกรองพาหะ β -thalassemia, พาหะ α -thalassemia 1 และ HbEE ได้เป็นอย่างดี ดังผลการศึกษาที่พบว่าในตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมดผู้ที่เป็นพาหะ β -thalassemia, พาหะ α -thalassemia 1 และ HbEE ทั้ง 11 ราย ให้ผลบวกต่อการทดสอบ OFT ทั้งหมด แต่ไม่สามารถคัดกรองพาหะ HbE ได้ 100% สอดคล้องกับการรายงานของ Fucharoen, G. และคณะ⁹ นอกจากนี้ยังไม่สามารถคัดกรองพาหะ HbCS ได้เช่นกัน ดังนั้นจำเป็นต้องใช้แนวทางอื่นในการคัดกรองพาหะทั้ง 2 ชนิดนี้ ซึ่งโดยทั่วไปจะคัดกรอง HbE โดยการตกตะกอนฮีโมโกลบินด้วย DCIP และวินิจฉัย HbCS ด้วยการทำ Hb typing และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ผลการศึกษาความคงตัวของตัวอย่างเลือดเมื่อแยกตามชนิดของพาหะธาลัสซีเมีย พบว่าพาหะ β -thalassemia มีความคงตัวที่ 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นความคงตัวจะลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 96 ตัวอย่างทุกรายให้ผลเป็นลบทั้งหมด α -thalassemia 1 มีความคงตัวที่ 32 ชั่วโมงและลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 48 ตัวอย่างทุกรายให้ผลเป็นลบทั้งหมด แต่ HbEE มีความคงตัวได้มากกว่าหรือเท่ากับ 120 ชั่วโมง ผลที่ได้เช่นนี้เนื่องจากเลือดที่ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง เมื่อเวลาผ่านไปเม็ดเลือดแดงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็น spherocyte มากขึ้นซึ่งเห็นได้จากการตรวจจุลทรรศน์ของตัวอย่าง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และสอดคล้องกับผลการตรวจค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงที่มีค่า MCV ลดลงแปรผันตามอายุการเก็บเลือด²¹ ซึ่งเม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างเป็น spherocyte จะมีแรงต้านความดันออสโมติกลดลง (increased osmotic fragility)²² จึงส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ง่ายขึ้นเมื่อทำการทดสอบ OFT ส่วนพาหะ HbE มีความคงตัว

ของเลือดที่ 16 ชั่วโมง โดยพาหะ HbE มีความคงตัวของตัวอย่างเลือดน้อยกว่ากลุ่ม β -thalassemia, α -thalassemia 1 และ HbEE ในรายที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบในชั่วโมงที่ 0 ก็ยังคงให้ผลเช่นเดิมตลอดการทดสอบ ไม่มีรายใดที่ให้ผลกลับมาเป็นบวก แสดงว่าการทดสอบ OFT ในรายที่ให้ผลเป็นลบไปแล้ว ไม่สามารถเกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ในภายหลัง แต่สำหรับรายที่ให้ผลเป็นบวกแล้วอาจให้ผลเป็นลบลงได้ (false negative) ดังข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ เหตุผลดังกล่าวนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดผลลบลงที่มักเกิดขึ้นกับการทดสอบ OFT ที่มีการเก็บตัวอย่างเลือดไว้หลายวันก่อนนำมาทำการทดสอบ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้การทดสอบ one-tube OF test (OFT) จะมีประสิทธิภาพในการคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง แต่ประสิทธิภาพของการทดสอบขึ้นอยู่กับลักษณะตัวอย่าง

เลือดที่นำมาทดสอบ โดยตัวอย่างเลือดมีความคงตัวต่อการทดสอบแตกต่างกันไปตามชนิดของพาหะ ดังนั้นเพื่อให้การตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (α -thalassemia 1, β -thalassemia) มีประสิทธิภาพสูงสุดควรทำการทดสอบให้เร็วที่สุดหลังจากเจาะเก็บเลือดหรือภายใน 32 ชั่วโมงจึงจะได้ความถูกต้องร้อยละ 100 วิธีการตรวจคัดกรองที่ได้ประสิทธิภาพถือเป็นหัวใจที่สำคัญที่สุดต่อความสำเร็จของการดำเนินงานตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียของประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษามหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่กรุณาเข้าร่วมโครงการ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่อุดหนุนงบประมาณ, เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย เป็นผลให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Winichagoon P, Thitvichianlert A, Lebnak T, Piankijagum A, Fucharoen S. Screening for the carriers of thalassemias and abnormal hemoglobins at the community level. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2002; 33 Suppl 2: 145-50.
- Wasi P. Thalassemia syndrome in Thailand. J Med Assoc Thai 1978; 61: 49.
- วิจารณ์ พานิช. การควบคุมและการป้องกันโรคธาลัสซีเมีย. ใน: สุรพล อิศรไกรศีล. บรรณาธิการ โลหิตวิทยา : การประชุมวิชาการประจำปีสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5, 28 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2534.
- The Thalassemia Working Party of the BCSH General Haematology Task Force. Guideline for investigation of the α and β -thalassemia traits. J Clin Pathol 1994; 47: 289-95.
- Sirichotiyakul S, Maneerat J, Sanguansermsri T, Dhananjananda P, Tongsong T. Sensitivity and specificity of mean corpuscular volume testing for screening for β -thalassemia-1 and α -thalassemia traits. J Obstet Gynaecol Res 2005; 31: 198-201.
- สุพรรณ พูเจริญ, กุลนภา พูเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรคของประเทศไทย. สงขลานครินทร์เวชสาร 2545; 20: 43-55.
- Thomas S, Srivastava A, Jeyaseelan L, Dennison D, Chandy M. NESTROFT as a screening test for the detection of thalassemia & common haemoglobinopathies an evaluation against a high performance liquid chromatographic method. Indian J Med Res 1996; 104: 194-97.
- Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Sae-ung N, Dangwibul S, Fucharoen S. A simplified screening strategy for thalassemia and haemo-

- globin E in rural communities in south-east Asia. Bull World Health Organ 2004; 82: 364-72.
9. Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Fucharoen G, *et al.* A reliable screening protocol for thalassemia and haemoglobinopathies in pregnancy; An alternative approach to electronic blood cell counting. Am J Clin Pathol 2005; 123: 113- 8.
 10. กุลนภา พู่เจริญ. การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียวด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป KKU-OF. ใน: กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, กุลนภา พู่เจริญ (บรรณาธิการ). การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2543: 18-20.
 11. กุลนภา พู่เจริญ. KKU – minicolumn chromatography for HbA₂/E. ใน: สุพรรณ พู่เจริญ, กุลนภา พู่เจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อการควบคุมและป้องกันโรคเลือดจางธาลัสซีเมียในประเทศไทย. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2546: 24-5.
 12. ณัฐยา แซ่อึ้ง, กุลนภา พู่เจริญ. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2539.
 13. Miller SA, Dyges DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215.
 14. Panyasai S, Sringam P, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. A simplified screening for α -thalassemia 1 (SEA type) using a combination of a modified osmotic fragility test and a direct PCR on whole blood cell lysates. Acta Haematol 2002; 108: 74-8.
 15. Eng B, Patterson M, Borys S, Chui DH, Waye JS. PCR-based diagnosis of the Filipino (—(FIL)) and Thai (—(THAI)) alpha-thalassemia-1 deletions. Am J Hematol 2000; 63: 54-6.
 16. Evatt BL, Gibbs WN, Lewis SM, McArthur JR. Fundamental Diagnostic Hematology (Anemia), 2nd ed. US Dept of Health and Human Service and WHO 1992.
 17. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ 2001; 79: 704-12.
 18. Panich V, Pornpatkul M, Sriroongrueng W. The problem of thalassemia in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992; 23 Suppl 2: 1-6.
 19. Wiwanitkit V, Suwansaksri J, Paritpokee N. Combined one-tube osmotic fragility (OF) test and dichlorophenol-indophenol (DCIP) test screening for hemoglobin disorders, an experience in 213 Thai pregnant women. Clin Lab 2002; 48: 525-28.
 20. Chow J, Phelan L, Bain BJ. Evaluation of Single-Tube Osmotic Fragility as a Screening Test for Thalassemia. Am J Hematol 2005; 79: 198-201.
 21. จำเนียร ศรีงาม. การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาของเลือดที่เก็บไว้ในสภาวะต่างๆ. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2004; 16: 57-62.
 22. Sears DA, Udden MM, Johnston MD. Red cell osmotic fragility studies in hemoglobin C-beta thalassemia: osmotically resistant microspherocytes. Clin Lab Haematol 2003; 25: 362-72.