

## บันทึก

## ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ปัญจะ กุลพงษ์ กับ ประวัติ และพัฒนาการของการตรวจกรองฮีโมโกลบินอี

กุลณา พู่เจริญ\*

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปแล้วว่าการตรวจกรองฮีโมโกลบินอี (Hb E) เป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งของ การดำเนินงานตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรคเลือดจางธาลัสซีเมียในประเทศไทยที่จะละลายไม่ได้<sup>1</sup> เนื่องจาก Hb E เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียงในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้<sup>2</sup> โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีอุบัติการณ์เฉลี่ยสูงถึงร้อยละ 30<sup>3</sup> ซึ่ง Hb E นั้นนอกจากจะไม่เสถียรแล้วยังทำหน้าที่ได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเกิด abnormal splicing ยีน Hb E จึงถูกจัดให้เป็นปีศาจธาลัสซีเมียชนิดหนึ่งด้วย<sup>4</sup> ผู้ที่มียีน Hb E ทั้งในภาวะเฮเทอโรไซโกทและโฮโมไซโกท จะไม่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียที่รุนแรง อาจมีอาการซีดบ้างเล็กน้อยในกรณีของโฮโมไซโกท แต่ในรายที่เป็นเฮเทอโรไซโกทแม้จะตรวจร่างกายโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญก็ไม่สามารถแยกได้จากคนปกติต้องตรวจเลือดเท่านั้นจึงจะทราบได้ เมื่อผู้ที่มียีน Hb E ไปแต่งงานกับผู้ที่มียีนปีศาจธาลัสซีเมียก็จะมีโอกาสให้กำเนิดบุตรที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง คือ  $\beta$ -thalassemia/Hb E ได้<sup>5</sup> ดังนั้นการตรวจเลือดเพื่อค้นหาผู้ที่มี

Hb E แฝงอยู่ในกลุ่มประชากรจึงเป็นขั้นตอนสำคัญของการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในประเทศไทย

โดยทั่วไปการตรวจกรอง หมายถึง การตรวจเบื้องต้นด้วยวิธีการทดสอบที่ทำได้ง่าย สะดวก ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และที่สำคัญคือสามารถทำการตรวจได้พร้อมกันที่หลายตัวอย่างโดยให้ผลการตรวจที่มีค่าความไวและความจำเพาะสูง โดยเฉพาะค่าความไวและค่าการทำนายผลลบควรจะให้ใกล้เคียงร้อยละ 100 จึงจะเป็นการตรวจกรองที่ดีที่สุดเนื่องจากตามขั้นตอนของการดำเนินงานการตรวจกรองธาลัสซีเมียของไทยนั้นตัวอย่างที่ให้ผลลบจากการตรวจกรองจะถูกคัดออกไปทันทีเพื่อเป็นการคัดกรองคนปกติออกไป ส่วนผู้ที่ให้ผลการตรวจกรองเป็นบวกก็จะต้องมีขั้นตอนนำไปตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานต่อไป<sup>6</sup>

การตรวจกรอง Hb E เริ่มจากการที่ Frischer H และคณะ<sup>7</sup> ได้พบโดยบังเอิญว่าสาร 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) สามารถออกซิไดซ์ (oxidize) Hb E ให้ตกตะกอนได้เนื่องจากโมเลกุลของ Hb E มีสายปีศาจโกลบินผิด

\* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปกติที่เกิดจากการดออะมิโนในตำแหน่งที่ 26 เปลี่ยนจากกรดกลูตามิก (Glutamic acid) ไปเป็นไลซีน (Lysine) (Hb E :  $\alpha_2\beta_2^{(Glu \rightarrow Lys)}$ ) เป็นผลให้หน่วยย่อยที่เกิดจากการรวมกันของสายอัลฟาโกลบินกับบีตาโกลบิน ( $\alpha_2\beta_2$ ) ในโมเลกุลของ Hb E ไม่แข็งแรงและเผยหมู่ซัลไฟไฮดริลอิสระ (-SH) ออกมา จึงถูกออกซิไดซ์ด้วยสาร DCIP ได้ง่ายและเร็วกว่าฮีโมโกลบินชนิดอื่นในช่วงพีเอชเป็นกลางและดกตะกอนในสารละลาย หลังจากนั้นไม่นาน ศ.นพ.ปัญญาจะ กุลพงษ์ และคณะ<sup>8</sup> ได้เป็นกลุ่มแรกของประเทศไทยที่ได้นำ DCIP มาใช้ในการตรวจ Hb E และ ฮีโมโกลบินไม่เสถียรอื่นที่มีหมู่ซัลไฟไฮดริลอิสระเช่นกัน คือ Hb H ซึ่งวิธีการตรวจที่ ศ.นพ.ปัญญาจะ กุลพงษ์ และคณะนำมาใช้นี้ต่อมาได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อการตรวจ Hb E<sup>9-12</sup> ครอบคลุมถึงปัจจุบัน และนับเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้ผู้เขียนและคณะเกิดแนวความคิดที่จะพัฒนาการตรวจกรอง Hb E มาอย่างต่อเนื่องเนื่องจากผู้เขียนและคณะปฏิบัติงานอยู่ในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของ Hb E สูง ได้มีโอกาสใกล้ชิดกับผู้ปฏิบัติงานในพื้นที่ และมีโอกาสออกไปปฏิบัติงานเพื่อการวิจัยในพื้นที่เองเป็นบางครั้ง จึงได้รับทราบถึงปัญหาและเข้าใจปัญหาของผู้ปฏิบัติงานในพื้นที่ที่จะต้องทำการทดสอบกับตัวอย่างเลือดจำนวนมากๆ เป็นจำนวนหลายร้อยตัวอย่าง จึงได้พยายามพัฒนาโดยลดขั้นตอนการตรวจลง<sup>13,14</sup> แต่ก็ยังพบว่า ปัญหาจากการอ่านผลโดยการดูตะกอน HbE ที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าทำได้ยากเนื่องจากน้ำยามีสีเข้มและพบว่าเป็นปัญหาหลักที่ทำให้ผลการตรวจผิดพลาดได้ง่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผู้ปฏิบัติงานที่ขาดประสบการณ์ในการฝึกฝนเพื่อการอ่านผล โดยเฉพาะทำให้เกิดผลลบปลอมได้ ขณะเดียวกันก็เกิดผลบวกปลอมได้มากถ้าไม่อ่านผลทันที ด้วยเหตุผลเหล่านี้ สุพรรณ พูเจริญ และคณะ<sup>15</sup> จึงได้พัฒนาน้ำยา DCIP ขึ้นมาอีกขั้นตอนหนึ่งซึ่งเป็น

พัฒนาการล่าสุดที่มีในปัจจุบัน นอกเหนือจากการใช้หลักการของ แอนติบอดีในการตรวจซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศของบริษัท Isolab (Hb E card, Isolab Corporation) ที่มีราคาแพงมากและไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรวจกรองประชาชนขนาดใหญ่ และการตรวจกรองด้วยวิธีไมโครคอลัมน์โครมาโตกราฟี (microcolumn chromatography) ซึ่งพัฒนาโดย ศ.นพ.ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรีและคณะ<sup>16</sup> ที่อาจมีข้อจำกัดในการเตรียมคอลัมน์เพื่อการประยุกต์ใช้ในวงกว้าง

การพัฒนาของ สุพรรณ พูเจริญ และคณะนี้ยังคงใช้ DCIP อยู่เหมือนเดิม แต่ปรับปรุงสูตรใหม่เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้นโดยใช้เวลาเพียง 15 นาที และเพิ่มน้ำยาอีกหนึ่งตัวเพื่อหยุดปฏิกิริยาและเปลี่ยนสีของน้ำยาให้จางลงทำให้ตัดปัญหาในการอ่านผลเพราะน้ำยามีสีเข้มและเกิดผลบวกปลอมเมื่อตั้งทิ้งไว้ เรียกชื่อน้ำยาชุดใหม่นี้ว่า KKU-DCIP-Clear (Khon Kaen University -Dichlorophenolindophenol precipitation - Clear) เพื่อให้เกียรติแก่สถาบันที่คณะผู้วิจัยทำงานอยู่ โดยได้ทดลองใช้โดยคณะผู้วิจัย<sup>15,17</sup> และส่งไปให้ผู้ปฏิบัติการในพื้นที่ได้ทดลองใช้ได้แก่ โรงพยาบาลอำเภอบึงกาฬ จังหวัดหนองคาย<sup>17</sup> โรงพยาบาลจังหวัดยโสธร และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวนรวม 436 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลลบ และค่าการทำนายผลบวก เท่ากับ ร้อยละ 100, 97.2, 100 และ 95.1 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าน้ำยาชุดใหม่นี้มีความไวดีมาก ส่วนความจำเพาะนั้น พบว่ามีบางตัวอย่างที่ยังให้ผลบวกปลอมได้ ซึ่งก็จะให้ผลบวกปลอมกับวิธีดั้งเดิมด้วย คาดว่าอาจเกิดจากตัวอย่างนั้นได้รับยาที่มีคุณสมบัติที่จะเสริมฤทธิ์ของ DCIP อยู่ อย่างไรก็ตามการให้ผลบวกปลอมกรณีนี้จะได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานต่อไปซึ่งมีจำนวนไม่มากนัก เมื่อเทียบกับวิธีเดิมที่ไม่ได้หยุดปฏิกิริยาและเกิด

ผลบวกปลอมได้ถ้าตั้งทิ้งไว้ไม่อ่านผลทันที ซึ่งน้ำยาชุดใหม่นี้พบว่าเลือดที่เก็บไว้นานไม่เกิน 1 เดือนจะไม่มีผลต่อการทดสอบ แต่ถ้าเป็นเลือดเก่าเกิน 1 เดือนและมีการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) จนหมดหรือเกือบหมด ผลการตรวจจะมีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลลบและค่าการทำนายผลบวกลดลง ดังเช่นที่คณะผู้วิจัยได้เคยทดสอบกับตัวอย่างเลือดของนักเรียนชั้นประถมศึกษาในเขตอำเภอเบ็ญกาฬจังหวัดหนองคายจำนวน 144 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลลบ และค่าการทำนายผลบวกเท่ากับร้อยละ 98.8, 93.6, 98.3 และ 95.2 ตามลำดับ โดยพบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรค Hb H ที่มีภาวะเลือดจาง แต่ตัวอย่างที่มี Hb E ให้ผลบวกทุกราย

น้ำยาชุดใหม่นี้ในปัจจุบันยังไม่มีจำหน่าย เนื่องจากอยู่ในระหว่างการรับทุนสนับสนุนจากสำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เพื่อให้พัฒนาเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปต้นแบบเพื่อนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไป โดยขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการส่งไปให้ทดลองใช้ในพื้นที่ที่ปฏิบัติงาน เพื่อขอคำแนะนำมาปรับปรุงให้ได้ชุดน้ำยาที่เหมาะสมกับผู้ใช้งาน สำหรับผู้สนใจที่ปฏิบัติงานในพื้นที่และมีความประสงค์จะขอทดลองใช้น้ำยาชุดใหม่นี้ติดต่อที่ ผศ.ดร.สุพรรณ พูเจริญ คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002 โทรศัพท์/โทรสาร (043) 347-482 e-mail : supan@kku1.kku.ac.th

ในโอกาสที่ ศ.นพ.ปัญญา ฤกษ์ ผู้ริเริ่มการตรวจ Hb E ด้วยเทคนิค DCIP ในประเทศไทย เกษียณอายุราชการ ผู้เขียนและ ผศ.ดร.สุพรรณ พูเจริญ ในฐานะศิษย์ของอาจารย์ ขออาราธนาคุณพระศรีรัตนตรัย จงดลบันดาลให้อาจารย์ ผู้อันเป็นที่เคารพรักของพวกเรา มีสุขภาพ พลานามัย

สมบูรณ์ ยั่งยืนนาน

### เอกสารอ้างอิง

1. วิจารย์ พานิช. การป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมีย. ใน สุรพล อิศโรกรศีล บรรณาธิการ. โลหิตวิทยา. สมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย, สุภาวิชันการพิมพ์ กรุงเทพฯ 2534.
2. Flatz G. Hemoglobin E : distribution and population dynamics. Humangenetik 1967; 3: 189-234.
3. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 1987; 11: 65-88.
4. สุพรรณ พูเจริญ. ฮีโมโกลบินอี. Thai Med Tech Letter (TMTL) 2540; 8: 21-9.
5. Weatherall DJ, Clegg JG. The Thalassemia Syndrome. 3rd ed, London, Blackwell Scientific Publication, 1983.
6. สุพรรณ พูเจริญ, กุลพงษ์ พูเจริญ. ธาลัสซีเมียและพาหะ : การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. Current Practice in Hematology 1997. ใน ธานินทร์ อินทรกำธรชัย บรรณาธิการ. การประชุมโลหิตวิทยากลางปี สมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย 18-19 สิงหาคม 2540 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
7. Frischer H, Bowman J. Hemoglobin E, an oxidatively unstable mutation. J Lab Clin Med 1975; 85: 531-9.
8. Kulapongs P, Sanguansermisri T, Mertz G, Tawarat S. Dichlorophenolindophenol (DCIP) precipitation test : a new screening test of Hb E and Hb H. J Pediatric Soc Thai 1976; 15: 1-7.

9. ยุพิน ใจแปง, กุลนภา พูเจริญ, เกรียงไกร กิจเจริญ, ญัฐยา แซ่อึ้ง, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการแบบง่ายเพื่อการตรวจกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2537; 5: 131-7.
10. กัลยาณี ดันศฤงฆาร, ปิยลัมพร ทะวานนท์, อรัญญา กิตติกัลยาวงศ์, ฉวีวรรณ อิ่มพันธ์. วิธีตรวจกรองโรคและพาหะธาลัสซีเมียโดย Dichlorophenol indophenol precipitation (DCIP). วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2538; 9: 89-95.
11. ประวีตร ฤทธิ์เจริญวัฒน์. การตรวจเลือดเพื่อวินิจฉัยโรคเลือดจางธาลัสซีเมียในโรงพยาบาลจังหวัดมหาสารคามและโรงพยาบาลชุมชน. การประชุมสัมมนาวิชาการเรื่อง การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ครั้งที่ 4 คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 21-22 พฤศจิกายน 2539.
12. Pengkliang C, Tasanakul T, Sapchatura M, *et al.* The effectiveness in screening test of thalassemia carriers in Phattalung provincial hospital. การประชุมสัมมนาวิชาการเรื่อง การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ครั้งที่ 4 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 21-22 พฤศจิกายน 2539.
13. กติกา ภวภูตานนท์, วิษย์ศักดิ์ สุขสะอาด, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, และคณะ. การตรวจกรองฮีโมโกลบินอีโดยการตกตะกอนด้วยสตีซีไอพีในกลุ่มประชากรที่ไม่ชีด. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2536; 5: 139-43.
14. กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, ญัฐยา แซ่อึ้ง, กรรณิการ์ กั้วหา, กุลนภา พูเจริญ. การทดสอบกรองเพื่อวินิจฉัยฮีโมโกลบินอีโดยการตกตะกอนด้วยไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่อุณหภูมิห้อง. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2538; 7: 131-7.
15. สุพรรณ พูเจริญ, ญัฐยา แซ่อึ้ง, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, เกรียงไกร กิจเจริญ, กุลนภา พูเจริญ. KKU-DCIP-Clear : ชุดน้ำยาตรวจกรองฮีโมโกลบินอีอย่างง่ายและรวดเร็ว. การประชุมสัมมนาวิชาการ เรื่อง การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียครั้งที่ 4 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 21-22 พฤศจิกายน 2539.
16. ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี, อารีรัตน์ ปัญญาเขียว, กวี ไชยศิริ, ศิราภรณ์ สวัสดิ์ดิ্বর. Hb E trait screening. การประชุมสัมมนาวิชาการ เรื่อง การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ครั้งที่ 4 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 21-22 พฤศจิกายน 2539.
17. กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, สมศักดิ์ กิตติศรีวรรณ, กุลนภา พูเจริญ, ญัฐยา แซ่อึ้ง, เกรียงไกร กิจเจริญ, สุพรรณ พูเจริญ. การตรวจกรอง Hb E ในพื้นที่ด้วยชุดน้ำยาตรวจกรอง KKU-DCIP Clear. บทคัดย่อ นำเสนอในที่ประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 21, 14-16 พฤษภาคม 2540 ณ โรงแรมเซ็นทรัลพลาซ่า กรุงเทพฯ.