

การประเมินประสิทธิภาพของ EE score ในการแยก Homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE

รวีวรรณ พวงพุกษ์ ยุพิน ใจแปง* ปรีพัส เนตรณี และ ธิดาอุมา เอื้องคำประเสริฐ

งานเวชศาสตร์ชั้นสูง ศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมา

บทคัดย่อ

β^0 -thalassemia/HbE และ homozygous HbE เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของยีนเบต้า-โกลบิน (β -globin gene) ซึ่งส่งผลต่อการสร้างฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง การวินิจฉัย β^0 -thalassemia/HbE และ homozygous HbE ในผู้ที่มีชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในสัดส่วนของ HbA₂/E มากกว่าร้อยละ 75 และ HbF อยู่ในช่วงร้อยละ 5.1 - 19.9 ไม่สามารถวินิจฉัยแยกทั้งสองชนิดออกจากกันได้ จำเป็นต้องอาศัยการตรวจยืนยันในระดับดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ EE score สามารถทำนาย β^0 -thalassemia/HbE ได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้ EE score ในการแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE โดยศึกษาแบบภาคตัดขวาง (cross-sectional study) จากการใช้ตัวอย่างเลือดของหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสที่มาฝากครรภ์ ณ โรงพยาบาลชุมชนในเขตสุขภาพที่ 9 ที่ได้รับการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย และส่งตรวจยืนยันธาลัสซีเมียที่ศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมา ซึ่งได้มีการตรวจหาปริมาณฮีโมโกลบินเอ สอง (HbA₂) ฮีโมโกลบินอี (HbE) ฮีโมโกลบินเอฟ (HbF) และฮีโมโกลบินผิดปกติ ด้วยวิธี capillary electrophoresis โดยมีจำนวน 142 รายที่ไม่สามารถแปลผลได้ว่าเป็น homozygous HbE หรือ β^0 -thalassemia/HbE จึงนำค่าผลตรวจปริมาณ HbA₂ และ HbF ไปคำนวณค่า EE score โดยค่าที่ได้ ≤ 60 แปลผลว่าเป็น homozygous HbE ซึ่งพบมีจำนวน 129 ราย และค่า EE score > 60 แปลผลว่าเป็น β^0 -thalassemia/HbE มีจำนวน 13 ราย และนำตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจวิเคราะห์ยืนยันโดยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีค่า EE score ≤ 60 เป็นชนิด homozygous HbE จำนวน 125 ราย และเป็นชนิด homozygous HbE ร่วมกับพาหะแอลฟา ศูนย์-ธาลัสซีเมีย 4 ราย ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า EE score > 60 เป็นชนิด homozygous HbE จำนวน 4 ราย homozygous HbE ร่วมกับพาหะแอลฟา ศูนย์-ธาลัสซีเมีย จำนวน 1 ราย β^0 -thalassemia/HbE จำนวน 6 ราย และ β^0 -thalassemia/HbE ร่วมกับพาหะแอลฟา ศูนย์-ธาลัสซีเมีย จำนวน 2 ราย ซึ่งแสดงว่าสามารถใช้ค่า EE score > 60 ในการคัดเลือตัวอย่างเพื่อส่งตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ โดยแสดงค่าประสิทธิภาพความไว ค่าความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก ค่าการทำนายผลลบ และค่า

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: jopang08@gmail.com

ความถูกต้องเท่ากับร้อยละ 100, 96.3, 61.5, 100 และ 96.5 ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงว่าสามารถนำค่า EE score ไปใช้ในการแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE ได้อย่างถูกต้อง ทำให้สามารถลดจำนวนตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอได้ถึงร้อยละ 90.8 ส่งผลลดค่าใช้จ่ายและภาระงานของผู้ปฏิบัติงานการตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยในโครงการป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมีย

คำสำคัญ: Homozygous HbE , β^0 -thalassemia/HbE, α^0 -thalassemia, EE score ประสิทธิภาพ

Efficiency Assessment of EE Score for Differentiation of Homozygous HbE and β^0 -thalassemia/HbE

Rawiwan Puangpruk, Yupin Jopang*, Paripat Netnee and Tida-uma Aungkumprasert

Laboratory Medicine Section, Regional Health Promotion Center 9, Nakhon Ratchasima Province, Thailand

Abstract

β^0 -thalassemia/HbE and homozygous HbE are inherited disorders caused by an abnormal β -globin gene that impairs hemoglobin (Hb) synthesis in red blood cells. Diagnosis of both β^0 -thalassemia/HbE and homozygous HbE, in which patients having HbA₂/E levels of >75% and HbF levels of 5.1% to 19.9%, must be confirmed by DNA analysis. However, it is noted that the use of the EE score can predict and classify β^0 -thalassemia/HbE. Therefore, this study aimed to evaluate the efficiency of EE score in identifying homozygous HbE and β^0 -thalassemia/HbE through a cross-sectional study. Blood samples of pregnant women and their husbands were collected for thalassemia screening in community hospitals in Health Area 9 and confirmatory tests including levels and types of HbA₂, HbE, HbF, and hemoglobinopathies were determined using capillary electrophoresis at Regional Health Promotion Center 9, Nakhon Ratchasima. A dataset of 142 subjects who were not interpretable for homozygous HbE and β^0 -thalassemia/HbE, was used in this study. The values of HbA₂ and HbF were used to calculate EE score. It was found that EE score ≤ 60 indicated homozygous HbE in 129 subjects, and EE score > 60 indicated β^0 -thalassemia/HbE in 13 subjects. The genotypes of thalassemia were examined using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) as the standard method. The results showed that the EE score ≤ 60 group were 125 subjects with homozygous HbE and four subjects with homozygous HbE with α^0 -thalassemia trait, while the EE score > 60 group consisted of four subjects with homozygous HbE, one subject with homozygous HbE with α^0 -thalassemia trait, six subjects with β^0 -thalassemia/HbE, and two subjects with β^0 -thalassemia/HbE with α^0 -thalassemia trait. The EE score > 60 can be used to select samples for further DNA analysis with statistical quality of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and accuracy of 100%, 96.3%, 61.5%, 100% and 96.5% respectively. The results indicated that

*Corresponding author E-mail address: jopang08@gmail.com

the application of EE score showed high accuracy in predicting homozygous HbE and β^0 -thalassemia/HbE as well as exhibited a significant reduction of 90.8% in the number of samples for DNA analysis. Therefore, the EE score could be helpful in diagnosis for thalassemia prevention and control program.

Keywords: Homozygous HbE, β^0 -thalassemia/HbE, α^0 -thalassemia, EE score, Efficiency

บทนำ

เบต้า-ธาลัสซีเมีย (β -thalassemia) เป็นความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเบต้า-โกลบิน (β -globin gene) แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือเบต้า ศูนย์-ธาลัสซีเมียและเบต้า บวก - ธาลัสซีเมีย ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของเบต้า-ธาลัสซีเมียร้อยละ 3-9⁽¹⁾ และฮีโมโกลบินอี (HbE) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเบต้า-โกลบินที่มีความผิดปกติทั้งโครงสร้างและปริมาณ จัดเป็นเบต้า บวก - ธาลัสซีเมีย⁽²⁾ ซึ่งพบอุบัติการณ์สูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย⁽³⁾ โดยทั่วไปผู้ที่ได้รับการถ่ายทอดยีนเบต้า-ธาลัสซีเมียเพียงยีนเดียว (heterozygous β -thalassemia) จะไม่มีอาการแสดงออกทางคลินิก แต่ผู้ที่ได้รับการถ่ายทอดยีนเบต้า-โกลบินผิดปกติ 2 ยีน (homozygous β -thalassemia) จะมีการแสดงออกทางคลินิกที่มีความรุนแรงแตกต่างกันไป ตั้งแต่มีอาการรุนแรงปานกลางจนถึงอาการรุนแรงมาก ยกเว้นผู้ที่ได้รับการถ่ายทอดยีน 2 ยีนของฮีโมโกลบินอี ที่เรียกว่า homozygous HbE จะมีอาการชืดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น^(4 - 6) สำหรับผู้ที่ได้รับการถ่ายทอดยีนเบต้า ศูนย์-ธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบินอี (β^0 -thalassemia/HbE) จะมีอาการรุนแรงน้อยจนถึงอาการรุนแรงมาก โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากจะมีอาการชืด อ่อนเพลีย ตัวเหลือง ม้ามโต และเจริญเติบโตช้า จำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือด และต้องได้รับยาขับธาตุเหล็กเป็นประจำ ซึ่งพบว่าเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขซึ่งต้องมีการป้องกันและควบคุม

การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับการวินิจฉัย β^0 -thalassemia/HbE และ homozygous HbE เป็นการตรวจคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีทดสอบความเปราะบางเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียว (one tube osmotic fragility test: OF test)⁽⁷⁾ และ/หรือ

การใช้ดัชนีเม็ดเลือดแดง^(8 - 9) ร่วมกับการตรวจฮีโมโกลบินอีโดยการตกตะกอนด้วยดีซีไอพี (dichlorophenol indolphenol; DCIP) ซึ่งหากการตรวจคัดกรองเบื้องต้นพบความผิดปกติจำเป็นต้องมีการตรวจยืนยันโดยการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน (Hb typing) ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) หรือ low-pressure liquid chromatography (LPLC) หรือ capillary electrophoresis (CE)^(10 - 11)

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าผู้ป่วยที่เป็น β^0 -thalassemia/HbE จะมีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EF มีสัดส่วนของ HbA_2/E เท่ากับร้อยละ 40 - 80 และ HbF เท่ากับร้อยละ 20 - 60 ในขณะที่ผู้ที่เป็น homozygous HbE จะมีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EE มีสัดส่วนของ $\text{HbA}_2/\text{E} \geq$ ร้อยละ 80 และ $\text{HbF} \leq$ ร้อยละ 5⁽¹²⁾ อย่างไรก็ตามยังมีรายงานพบว่าผู้ที่ เป็น β^0 -thalassemia/HbE และ homozygous HbE ส่วนหนึ่งจะมีสัดส่วนของ $\text{HbA}_2/\text{E} >$ ร้อยละ 75 และ HbF ร้อยละ 5.1-19.9^(12 - 13) จึงทำให้ไม่สามารถแยกความผิดปกติของโรคทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้ ส่งผลให้เกิดปัญหาในการแปลผลทางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องตรวจยืนยันความผิดปกติในระดับดีเอ็นเอ สำหรับการตรวจ Hb typing ด้วยเทคนิค CE จะสามารถแยกชนิดฮีโมโกลบินเอ สอง (HbA_2) ออกจากฮีโมโกลบินอีได้ และจากการศึกษาที่ผ่านมา⁽¹⁴⁾พบว่าปริมาณฮีโมโกลบินเอ สอง และฮีโมโกลบินเอฟสามารถทำนาย β^0 -thalassemia/HbE ได้อย่างถูกต้องจากการใช้สูตรคำนวณ คือ $\text{EE score} = 7.3 \text{ HbA}_2 + \text{HbF}$ หาก $\text{EE score} \leq 60$ จะแปลผลว่าเป็น homozygous HbE แต่ถ้า $\text{EE score} > 60$ จะแปลผลว่าสงสัยเป็น β^0 -thalassemia/HbE และควรตรวจเพิ่มเติมด้วยการวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมี

วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้ EE score ในการแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE โดยเปรียบเทียบกับ การตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

วัสดุและวิธีการ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (cross-sectional study) โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ของหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลชุมชนในเขตสุขภาพที่ 9 จำนวน 9,092 ราย โดยมีการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (complete blood count; CBC) ซึ่งประกอบด้วย ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cell; RBC) ระดับฮีโมโกลบิน (hemoglobin; Hb) ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit; Hct) ค่าเฉลี่ยปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดง (mean corpuscular volume; MCV) ค่าเฉลี่ยน้ำหนักฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (mean corpuscular hemoglobin; MCH) และค่าความกว้างของการกระจายตัวของเม็ดเลือดแดงที่ต่างปริมาณกัน (red cell distribution width; RDW) และส่งตรวจยืนยัน Hb typing ที่งานเวชศาสตร์ชั้นสูง ศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมา ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2563 - เมษายน 2564 การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กรมอนามัย เลขที่ 014/2563 ลงวันที่ 13 กรกฎาคม 2563

การตรวจ Hb typing

นำตัวอย่างเลือดทั้งหมดไปตรวจวิเคราะห์ Hb typing ด้วยเทคนิค capillary electrophoresis (CE) โดยใช้เครื่อง Sebia capillary II (Capillary 2 Flex Piercing; Sebia, Lisses, France) และนำตัวอย่างเลือดที่มีผล Hb typing เป็น EE หรือ EF

ที่มีปริมาณ HbE > ร้อยละ 75 และ HbF ร้อยละ 5.1 - 19.9 ไปคำนวณหาค่า EE score โดยใช้สูตรคำนวณ EE score = $7.3 \text{ HbA}_2 + \text{HbF}$ และแปลผลดังนี้

EE score ≤ 60 แปลผลว่าเป็น homozygous HbE

EE score > 60 แปลผลว่าสงสัยเป็น β^0 -thalassemia/HbE และควรตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมในระดับดีเอ็นเอ

จากนั้นแบ่งข้อมูลทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีค่า EE score ≤ 60 และกลุ่มที่ 2 มีค่า EE score > 60

การตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อตรวจหาความผิดปกติของยีน β^E mutation (heterozygosity และ homozygosity) ยีนเบต้า-ธาลัสซีเมียและยีนแอลฟา-ศูนย์ - ธาลัสซีเมีย ชนิด SEA และ THAI deletion โดยวิธี real-time PCR^(15, 16)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงใช้สถิติเชิงพรรณนา ประกอบด้วย ค่ามัธยฐาน ค่าต่ำสุด และค่าสูงสุด การเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มประชากร 2 กลุ่มใช้วิธี Mann-Whitney U test และศึกษาประสิทธิภาพของ EE score ในการแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE โดยคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าการทำนายผลบวก (positive predictive value) ค่าการทำนายผลลบ (negative predictive value) และค่าความถูกต้อง (accuracy) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานโดยใช้โปรแกรม STATA version 10

ผลการศึกษา

1. ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดง ผลตรวจ Hb typing และผลตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ

ผลการศึกษาพบตัวอย่างเลือดที่มีผล Hb typing เป็น EE หรือ EF จำนวนทั้งหมด 142 ราย ที่มีค่า HbE > ร้อยละ 75 และ HbF อยู่ในช่วงร้อยละ 5.1 - 19.9 โดยมีตัวอย่างเลือดที่มีค่า EE score ≤ 60 เท่ากับ 129 ราย และค่า EE score > 60 เท่ากับ 13 ราย เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอเพื่อหาความผิดปกติของยีนแอลฟา ศูนย์ - ธาลัสซีเมีย และยีนเบต้า-ธาลัสซีเมีย พบว่าในกลุ่มที่มีค่า EE score ≤ 60 แปลผลว่าเป็น homozygous HbE จำนวน 125 ราย และ homozygous HbE ร่วมกับพาหะแอลฟา ศูนย์ - ธาลัสซีเมีย จำนวน 4 ราย สำหรับกลุ่มที่มีค่า EE score > 60 แปลผลว่าเป็น homozygous HbE จำนวน 4 ราย homozygous HbE ร่วมกับพาหะแอลฟา ศูนย์ - ธาลัสซีเมีย จำนวน 1 ราย β^0 -thalassemia/HbE จำนวน 6 ราย และ β^0 -thalassemia/HbE ร่วมกับพาหะแอลฟา ศูนย์ - ธาลัสซีเมีย จำนวน 2 ราย และการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง (RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, RDW) ค่า HbE+A₂ ค่า HbA₂ และค่า HbF ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด และการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างประชากร 2 กลุ่มโดยไม่คำนึงถึงการมีความผิดปกติของพาหะแอลฟา ศูนย์ - ธาลัสซีเมียร่วมด้วยแสดงใน Table 1 และ Fig. 1 โดย Table 2 แสดงการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง ค่า HbE+A₂ ค่า HbA₂ และค่า HbF ของกลุ่มตัวอย่างที่ EE score > 60 จำนวน 13 ราย

2. ประสิทธิภาพการแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE โดย EE score เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

เมื่อนำข้อมูลไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้ค่า EE score > 60 ในการแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE โดยเปรียบเทียบกับผลตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานพบว่าได้ค่าความไวร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะร้อยละ 96.3 ค่าการทำนายผลบวก ร้อยละ 61.5 ค่าการทำนายผลลบร้อยละ 100 และค่าความถูกต้องร้อยละ 96.5 ดังแสดงใน Table 3

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดงระหว่าง homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE โดยไม่คำนึงถึงการมีความผิดปกติของพาหะแอลฟา ศูนย์ - ธาลัสซีเมียร่วมด้วย พบว่าค่า Hb, Hct, MCV, MCH และค่าร้อยละ HbE+A₂ ใน β^0 -thalassemia/HbE มีค่าต่ำกว่าใน homozygous HbE แต่ค่า RDW ค่าร้อยละ HbA₂ และ ร้อยละ HbF มีค่าสูงกว่า โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากการศึกษาของวัชร ประสิทธิ์ และคณะ⁽¹⁷⁾ พบว่าเมื่อใช้ค่าร้อยละ HbA₂ > ร้อยละ 6 สามารถแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE ได้ โดยมีค่าความถูกต้องร้อยละ 96.4 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำข้อมูลจากการศึกษามาวิเคราะห์ตามวิธีดังกล่าวและเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ได้ค่าความถูกต้องร้อยละ 93.7 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเป็นผลจากจำนวนตัวอย่างในการศึกษาของวัชร ประสิทธิ์ และคณะ มีมากกว่า นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ใช้ค่าร้อยละ HbA₂ > ร้อยละ 6 ร่วมกับค่า MCV < 55 เฟมโตลิตร ตามที่วัชร ประสิทธิ์ และคณะ ได้แนะนำไว้ และสามารถแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE ได้ ค่าความถูกต้องร้อยละ 96.4 ซึ่งมากกว่าการใช้ค่าร้อยละ HbA₂ > ร้อยละ 6 เพียงพารามิเตอร์เดียว โดยค่าความถูกต้องที่ได้ใกล้เคียงกับการใช้ค่า EE score

Table 1 Hematological parameters and Hb profiles observed among homozygous HbE, homozygous HbE with α^0 -thalassemia, β^0 -thalassemia/HbE, β^0 -thalassemia/HbE with α^0 -thalassemia, homozygous HbE with or without α^0 -thalassemia and β^0 -thalassemia/HbE with or without α^0 -thalassemia subjects.

Group ^a	No	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)	HbE+A ₂ (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
Homozygous HbE	129	5.4 (4.0 - 7.0)	11.5 (8.6 - 15.7)	34.4 (26.2 - 47.2)	63.9 (53.7 - 76.6)	21.4 (18.0 - 25.7)	17.2 (13.4 - 23.4)	89.8 (77.6 - 94.6)	4.9 (2.9 - 7.8)	8.3 (5.1 - 19.9)
Homozygous HbE with α^0 -thalassemia	5	5.5	9.5	28.7	54.0	17.3	18.1	88.4	5.0	7.5
β^0 -thalassemia/HbE	6	5.2 (5.2 - 6.4)	8.6 (7.7 - 14.2)	28.6 (28.0 - 43.1)	53.6 (52.4 - 66.9)	17.0 (14.1 - 22.0)	21.6 (14.1 - 21.5)	84.0 (83.1 - 92.2)	7.8 (4.5 - 8.5)	15.3 (5.6 - 13.5)
β^0 -thalassemia/HbE with α^0 -thalassemia	2	5.7, 7.0 (4.4 - 6.3)	9.5, 10.9 (7.9 - 10.6)	28.0, 32.6 (24.7 - 32.1)	48.6, 46.6 (50.2 - 59.0)	16.5, 15.0 (15.8 - 18.0)	25.2, 21.0 (19.7 - 29.5)	80.9, 90.1 (80.2 - 87.5)	9.4, 9.8 (7.2 - 8.9)	18.7, 9.9 (12.5 - 19.2)
Homozygous HbE with or without α^0 -thalassemia	134	5.4 (4.0 - 7.0)	11.5 (7.7 - 15.7)	34.3 (26.2 - 47.2)	63.8 (52.4 - 76.6)	21.4 (14.1 - 25.7)	17.2 (13.4 - 23.4)	89.7 (77.6 - 94.6)	4.9 (2.9 - 8.5)	8.3 (5.1 - 19.9)
β^0 -thalassemia/HbE with or without α^0 -thalassemia	8	5.6 (4.4 - 7.1)	9.3 (7.9 - 10.9)	29.4 (24.7 - 32.6)	50.9 (46.6 - 59.0)	16.6 (15.0 - 18.0)	21.6 (19.7 - 29.5)	84.0 (80.2 - 90.1)	8.15 (7.2 - 9.8)	15.3 (9.9 - 19.2)
p-value*		0.8526	0.0003	0.0013	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0052	<0.0001	0.0004

*Comparison between homozygous HbE with or without α^0 -thalassemia and β^0 -thalassemia/HbE with or without α^0 -thalassemia by using Mann-Whitney U test with statistical significance at p-value < 0.05. Values are presented as median (min-max) or as raw data where appropriate.

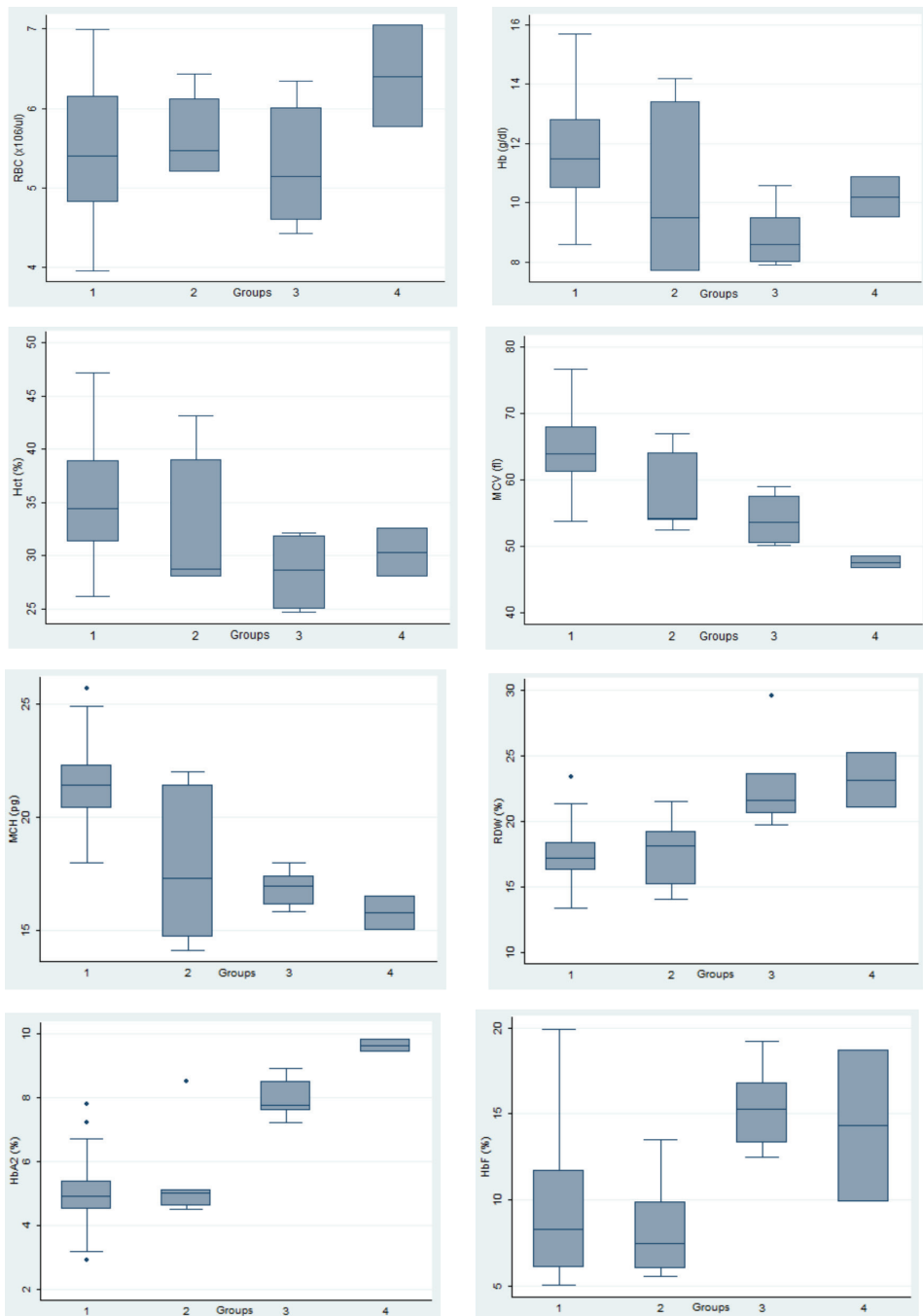


Fig. 1 Box plots of RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, RDW, HbA₂ and HbF in 4 groups of thalassemia genotypes. Group 1: Homozygous HbE, Group 2: Homozygous HbE with α^0 -thalassemia trait, Group 3: β^0 -thalassemia/HbE, and Group 4: β^0 -thalassemia/HbE with α^0 -thalassemia trait. Box plots were prepared using the STATA statistical program version 10.

Table 2 Hematological parameters, levels of Hbs E+A₂, HbA₂, HbF and DNA analysis observed in 13 cases of sample population with EE score >60.

No	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)	HbE+A ₂ (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	EE score	α^0 -thal gene	β -thal gene
1	5.98	12.6	38.7	65.0	21.1	23.4	86.4	6.6	12.6	60.8	Negative	Positive for homozygous HbE gene
2	5.72	11.0	32.0	55.9	19.2	19.0	84.9	6.7	11.7	60.6	Negative	Positive for homozygous HbE gene
3	6.20	12.6	39.4	63.6	20.4	20.6	80.8	6.1	19.2	63.7	Negative	Positive for homozygous HbE gene
4	6.52	12.0	39.8	61.0	18.4	21.0	83.7	6.0	16.3	60.1	Negative	Positive for homozygous HbE gene
5	5.47	9.5	28.7	52.4	17.3	21.5	83.7	8.5	6.0	68.1	Positive (SEA)	Positive for homozygous HbE gene
6	6.35	10.6	32.1	50.5	16.7	19.7	87.5	8.5	12.5	74.6	Negative	Positive for codon 17 gene and HbE gene
7	4.93	7.9	24.7	50.2	16.1	21.0	85.1	7.9	5.1	62.8	Negative	Positive for codon 41/42 gene and HbE gene
8	5.37	9.2	31.8	59.0	17.2	20.6	86.0	7.6	13.3	68.8	Negative	Positive for codon 41/42 gene and HbE gene
9	4.43	8.0	25.0	56.0	18.0	22.2	83.2	8.9	16.8	81.8	Negative	Positive for codon 41/42 gene and HbE gene
10	6.01	9.5	30.8	51.3	15.8	23.6	80.2	7.2	19.2	71.8	Negative	Positive for codon 41/42 gene and HbE gene
11	4.6	8.0	26.5	57.6	17.4	19.5	80.2	7.7	15.5	71.7	Negative	Positive for codon 41/42 gene and HbE gene
12	5.76	9.5	28.0	48.6	16.5	25.2	80.9	9.4	18.7	87.3	Positive (SEA)	Positive for codon 17 gene and HbE gene
13	7.05	10.9	32.6	46.6	15.0	21.0	90.1	9.8	9.9	81.4	Positive (SEA)	Positive for codon 17 gene and HbE gene

Table 3 Efficiency of EE score for identification of homozygous HbE and β^0 -thalassemia/HbE compared with the standard method

Diagnosis	DNA analysis		Total
	β^0 -thalassemia/HbE	Non β^0 -thalassemia/HbE (homozygous HbE)	
EE score > 60	8	5	13
EE score ≤ 60	0	129	129
Total	8	134	142

Value above 60 indicates β^0 -thalassemia/HbE whereas that of or less than 60 points to a homozygous HbE, sensitivity = $(8/8) \times 100 = 100\%$, specificity = $(129/134) \times 100 = 96.3\%$, positive predictive value = $(8/13) \times 100 = 61.5\%$, negative predictive value = $(129/129) \times 100 = 100\%$, and accuracy = $(137/142) \times 100 = 96.5\%$.

การใช้ค่า EE score เพื่อแยกแยะระหว่าง homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE พบว่าได้ค่าความถูกต้องมากถึงร้อยละ 96.5 ทำให้สามารถลดจำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอได้ถึง 129 รายจากจำนวนทั้งหมด 142 ราย (ร้อยละ 90.8) และสามารถลดค่าใช้จ่ายสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอได้ถึง 154,800 บาท โดยราคาค่าตรวจยีนเบต้า-ธาลัสซีเมีย เท่ากับ 1,200 บาทต่อตัวอย่าง แต่การศึกษาค้างนี้ยังมีข้อจำกัดเรื่องจำนวนตัวอย่างเลือดที่มีผลตรวจ Hb typing เป็น EE หรือ EF ที่มีค่า EE score > 60 มีจำนวนน้อย ทั้งนี้สาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากอุบัติการณ์ของ β^0 -thalassemia/HbE ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 9 ซึ่งจากการคำนวณความถี่ของยีนเบต้า ศูนย์ - ธาลัสซีเมีย และยีนฮีโมโกลบินอี พบว่าในแต่ละปีมีเด็กเกิดใหม่เป็นโรค β^0 -thalassemia/HbE ประมาณ 70 ราย⁽¹⁸⁾ และด้วยการดำเนินงานป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมียในพื้นที่ที่ดำเนินงานมามากกว่า 20 ปี ทำให้สามารถยุติการตั้งครรภ์ในกรณีเด็กในครรภ์เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้มากกว่าร้อยละ 80⁽¹⁹⁾ จึงทำให้เด็กเกิดใหม่ที่เป็นโรค β^0 -thalassemia/HbE

ในพื้นที่มีอุบัติการณ์น้อยลง นอกจากนี้จากผลการศึกษายังพบว่าได้ค่าความจำเพาะ และค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 96.3 และ ร้อยละ 61.5 ตามลำดับ โดยค่าการทำนายผลบวกต่ำกว่าการศึกษาของกฤษฎา และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่พบค่าความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 96.5 และร้อยละ 85.7 ตามลำดับ และจากการศึกษาของ ชญา ศาสตร์สุข⁽²⁰⁾ ซึ่งใช้ EE score ศึกษาข้อมูลย้อนหลังของผลตรวจแยกชนิดของฮีโมโกลบิน ในหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสให้ค่าความจำเพาะ และค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 100 และร้อยละ 100 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการศึกษาทั้งสองใช้ตัวอย่างเลือดที่มีผล Hb typing เป็น EE, EE หรือ EF และ EF ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้ตัวอย่างเลือดที่มีผล Hb typing เป็น EE หรือ EF จึงทำให้ค่าการทำนายผลบวกของการศึกษานี้ต่ำกว่าผลการศึกษาที่ผ่านมา และจากการศึกษาของกฤษฎา และคณะ⁽¹⁴⁾ ได้มีการแนะนำให้ใช้ตัวอย่างเลือดที่เจาะภายใน 4 สัปดาห์และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากอาจส่งผลให้ระดับฮีโมโกลบินเอฟและฮีโมโกลบินเอ สอง ต่ำลงได้ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาค้างนี้ไม่พบผลลบปลอม แม้ตัวอย่าง

เลือดจะถูกส่งมาจากโรงพยาบาลชุมชนในเขตสุขภาพที่ 9 ทางไปรษณีย์บริการส่งด่วน (EMS) ซึ่งอุณหภูมิระหว่างการขนส่งอาจไม่ใช้ที่ 4 องศาเซลเซียสตามที่ได้แนะนำไว้ในการศึกษาที่ผ่านมา

ผลการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงการใช้ค่า EE score ที่สามารถแยก homozygous HbE และ β^0 -thalassemia/HbE ได้ โดยได้ค่าความถูกต้องถึงร้อยละ 96.5 ทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายและภาระงานของผู้ปฏิบัติงานการตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานที่เป็นหน่วยรับตรวจยืนยันธาลัสซีเมียในการกำหนดกลุ่มสมรสที่เสี่ยงต่อการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเพื่อใช้เป็นแนวทางคัดเลือกว่าอย่างส่งตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. *Hemoglobin* 1987; 11: 65-85.
2. Wasi P, Pootrakul S, Pootrakul P, *et al.* Thalassemia in Thailand. *Ann NY Acad Sci* 1980; 344: 352-63.
3. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-Ung N, *et al.* Molecular and hematological characterization of Hb E heterozygote with alpha-thalassemia determinant. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28 (suppl3): 100-3.
4. Fucharoen S, Ketvichit P, Pootrakul P, *et al.* Clinical manifestation of beta-thalassemia/hemoglobin E disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22: 552-7.
5. Fucharoen S, Winichagoon P, Pootrakul P, *et al.* Variable severity of Southeast Asian beta⁰-thalassemia/HbE disease. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1987; 23: 241-8.
6. Tachavanich K, Viprakasit V, Chinchang W, *et al.* Clinical and hematological phenotype of homozygous hemoglobin E: Revisit of a benign condition with hidden reproductive risk. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40: 306-16.
7. Sirichotiyakul S, Tantipalakorn C, Sanguansermisri T, *et al.* Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; 86: 347-50.
8. Tatsumi N, Tsuda I, Funahara Y, *et al.* Automatic measurement of hemoglobin F in blood obtained from patients with hemoglobin E/E and beta-thalassemia/hemoglobin E. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992; 23 (S2): 91-4.
9. Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Fucharoen G, *et al.* A reliable screening protocol for thalassemia and hemoglobinopathies in pregnancy: an alternative approach to electronic blood cell counting. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 113-8.
10. Nathalang O, Nillakupt K, Arnutti P, *et al.* Screening for thalassemia and hemoglobinopathy in a rural area of Thailand: a preliminary study. *J Med Assoc Thai* 2005; 88(S3): 35-42.

11. Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verweij M, *et al.* Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int J Lab Hematol* 2009; 31: 484-95.
12. Working party of the review board on laboratory diagnosis for thalassemia and hemoglobinopathies. Update a laboratory manual of thalassemia and hemoglobinopathies 2015. 6th ed. Nonthaburi: Knock out blow Co., Ltd. 2015. (in Thai)
13. Pornprasert S, Moriyama A, Kongthai K, *et al.* Detection of beta-thalassemia/hemoglobin E disease in samples which initially were diagnosed as homozygous hemoglobin E. *Clin Lab* 2013; 59: 693-7.
14. Singha K, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, *et al.* EE score: an index for simple differentiation of homozygous hemoglobin E and hemoglobin E- β^0 -thalassemia. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 1507-13.
15. Saetung R, Ongchai S, Charoenkwan P, *et al.* Genotyping of beta-thalassemia trait by high resolution DNA melting analysis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2013; 44: 1055-64.
16. Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, *et al.* Detection of alpha-thalassemia1 Southeast Asian type using real-time gap PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol* 2008; 80: 510-4.
17. Prasing W, Pornprasert S. Measurement of HbA₂ by capillary electrophoresis for diagnosing β -thalassemia/HbE disease in patients with low HbF. *Lab Med* 2014; 45: 226-30.
18. Jopang Y. Situation for prevention and control thalassemia program in Region 9. In: Working party of the committee for prevention and control of thalassemia, editor. A manual book of thalassemia guide for prevention and control in Region 9. 1st ed. Nakhon Ratchasima. Indy Art Co., Ltd. 2016: 1-8. (in Thai)
19. Jopang Y, Khongsawad S, Auswagul O, *et al.* Effectiveness of a prenatal diagnosis service model for pregnant women at risk of thalassemia in Nakhon Ratchasima province. *Bull of the Department of Med Sci* 2018; 60: 97-107. (in Thai)
20. Sartsuk C. The application for using EE score for diagnosis between Homozygous HbE and beta-thalassemia/HbE. Proceeding of the 24th meeting of National thalassemia; 2019. (in Thai)