การตรวจคัดกรองโรคภาวะบกพร่องฮอร์โมนต่อมหมวกไตแต่กำเนิดชนิดขาดเอนไซม์ 21-hydroxylase ของทารกแรกเกิดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย

สาวิตรี นาคประสิทธิ์[1] สุมณฑา ไชยสมจิตร[1] บุญนิภา สงคราม[2] วไลพร โรจน์สง่า[3] และเกวลี อุณจักร[4]

[1]สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

[2]ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุดรธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง อุดรธานี 41000

[3]โรงพยาบาลอุดรธานี อำเภอเมือง อุดรธานี 41000

[4]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ โรคภาวะบกพร่องฮอร์โมนต่อมหมวกไตแต่กำเนิด (Congenital Adrenal Hyperplasia: CAH) เป็นโรคพันธุกรรม เกิดจากการขาดเอนไซม์ 21-hydroxylase ทารกแรกเกิดมีภาวะเสียน้ำ เสียเกลือ และอวัยวะเพศกำกวมในเด็กหญิง ถ้าผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมและทันเวลาจะเสียชีวิตได้ การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่องการตรวจคัดกรองโรค CAH ในเขตสุขภาพที่ 8 เพื่อหาอุบัติการณ์การเกิดโรคและปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจคัดกรอง โดยเก็บตัวอย่างกระดาษซับเลือดจากทารก จำนวน 39,503 ราย สำหรับตรวจวิเคราะห์ระดับ 17-OHP (17α-Hydroxyprogesterone) โดยวิธี ELISA พบผลบวก จำนวน 34 ราย ตรวจยืนยันผล 33 ราย และมีผลบวก 20 ราย แต่ไม่พบทารกเป็นโรค CAH ชนิดรุนแรง ทารกที่มีผลการตรวจคัดกรองมีผลบวก พบว่ามีอายุครรภ์มารดาและน้ำหนักแรกเกิดต่ำกว่าเกณฑ์ร้อยละ 76.47 และ 61.76 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน 17-OHP ในกลุ่มตัวอย่างตรวจคัดกรองปกติแบ่งตามอายุครรภ์และน้ำหนักแรกเกิด พบว่าทารกที่คลอดก่อนกำหนดและน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์จะมีระดับ 17-OHP สูงกว่าทารกแรกเกิดที่คลอดตามกำหนดและน้ำหนักปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และปัจจัยที่มีผลต่อระดับ 17-OHP คือ อายุครรภ์มารดาและน้ำหนักแรกเกิด

คำสำคัญ: โรคภาวะบกพร่องฮอร์โมนต่อมหมวกไตแต่กำเนิด, การตรวจคัดกรอง, กระดาษซับเลือด, อีไลซ่า

Corresponding author E-mail: sawittree.n@dmsc.mail.go.th

Received: 17 August 2020 *Revised: 18 March 2021* *Accepted: 21 April 2021*

บทนำ

โรคภาวะบกพร่องฮอร์โมนต่อมหมวกไตแต่กำเนิด (Congenital Adrenal Hyperplasia: CAH) เป็นโรคทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน CYP21A2[1] ทำให้ขาดเอนไซม์ในการสังเคราะห์คอร์ติซอลของต่อมหมวกไต ผู้ป่วยโรคนี้มากกว่าร้อยละ 95[2] ขาดเอนไซม์ 21-hydroxylase จึงทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ Progesterone ไปเป็นอัลโดสเตอโรน (aldosterone) และเปลี่ยนไปเป็น 17α-Hydroxyprogesterone (17-OHP) และสารนี้ไม่สามารถสังเคราะห์ไปเป็น 11-Deoxycortisol ได้ ทำให้ไม่สามารถสร้างคอติซอล (cortisol) ได้ จึงเกิดการสะสมปริมาณของ 17-OHP ที่สูงขึ้น เมื่อต่อมหมวกไตไม่สามารถสร้างฮอร์โมนคอติซอลและอัลโดสเตอโรน จึงเกิดภาวะต่อมหมวกไตทำงานบกพร่องแบบเฉียบพลัน โดยทารกแรกเกิดทั้งเพศชายและหญิงจะแสดงอาการเสียเกลือและน้ำ (salt wasting form) เมื่ออายุประมาณ 1-2 สัปดาห์ขึ้นไป นอกจากนี้มีการสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) มากผิดปกติ ทำให้เกิดอวัยวะเพศกำกวมในทารกเพศหญิง กรณีที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยและการรักษาที่ถูกต้อง ทารกกลุ่มนี้มักเสียชีวิตเมื่ออายุเฉลี่ยประมาณ 1.15 เดือน[3] กลุ่มที่ไม่มีอาการเสียเกลือและน้ำ (simple virilizing form) จะพบอวัยวะเพศกำกวมเมื่อแรกเกิดในเด็กหญิง และมีลักษณะทางเพศทุติยภูมิแบบต่างเพศ (secondary sex characteristic) เมื่ออายุมากขึ้น ในทารกเพศชายจะมีลักษณะทางเพศทุติยภูมิเกิดขึ้นเร็วกว่าปกติ เกิดภาวะเป็นหนุ่มก่อนวัยและมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปกติ อายุกระดูกล้ำหน้าอายุจริง กระดูกจะปิดติดกันเร็ว ทำให้หยุดเจริญเติบโตเป็นผู้ใหญ่ตัวเตี้ยในที่สุด

มีการตรวจโรค CAH ครั้งแรกในชาวเอสกิโม หลังจากนั้นมีพัฒนาการตรวจคัดกรองไปอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันมีมากกว่า 30 ประเทศ ที่มีจัดตั้งระบบการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดภาวะบกพร่องฮอร์โมนจากต่อมหมวกไต อุบัติการณ์การเกิดโรคในต่างประเทศมีดังนี้ คือ ชาวเอสกิโม 1: 282 ราชอาณาจักรซาอุดิอาระเบีย 1: 5,000 สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล 1: 7,500 สหราชอาณาจักร 1: 12,000 สหรัฐอเมริกา 1: 18,170 นิวซีแลนด์ 1: 21,000[4, 5, 6] ในประเทศไทยมีการรายงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปี พ.ศ. 2542 และโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2551 มีอุบัติการณ์ 1: 19,512 และ 1: 5,771 ตามลำดับ[7, 8] นอกจากนี้ยังพบรายงานจากการศึกษาข้อมูลเวชระเบียนคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยต่าง ๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2522 ถึง พ.ศ. 2554 มีผู้ป่วยโรคนี้จำนวนทั้งหมด 180 ราย เพศชาย 57 ราย เพศหญิง 123 ราย[9, 10, 11, 12]

วิธีการตรวจคัดกรองโรค CAH จะตรวจวิเคราะห์ระดับของ 17-OHP ในกระดาษซับเลือดแห้ง เทคนิควิธีที่นิยมนำมาใช้มีหลากหลายวิธี ได้แก่ เรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (radioimmunoassay) อีไลซ่า (enzyme-linked immunosorbent assay) ฟลูโอริเมตรี (fluorimetry) และแทนเดม แมสส์สเปกโทรเมตรี (tandem mass spectrometry) เป็นต้น ในบางประเทศได้นำวิธีการวิเคราะห์ตรวจยืนยันผลจากยีนด้วยเทคนิควิธีทางด้านโมเลกุล (molecular analysis) เพื่อลดปัญหาการเกิดผลบวกปลอมที่เกิดจากการตรวจคัดกรอง ซึ่งมารดาและทารกที่มีภาวะเครียดหลังการคลอดบุตร ทำให้มีอัตราเมตาบอลิซึมของฮอร์โมนสูงโดยที่ไม่มีอาการของโรค โดยเฉพาะในทารกที่คลอดก่อนกำหนด น้ำหนักแรกเกิดน้อย และมีอาการเจ็บป่วยอื่น ๆ[3, 13, 14]

จากข้อมูลของประเทศไทย พบว่าโรค CAH เป็นปัญหาต่อระบบสาธารณสุขของประเทศ โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีรายงานอุบัติการณ์ของโรคนี้สูง[8] ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษานำร่องเพื่อพัฒนาการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดโรคภาวะบกพร่องฮอร์โมนต่อมหมวกไตชนิดขาดเอนไซม์ 21-hydroxylase ใน 7 จังหวัด ซึ่งอยู่ในเขตสุขภาพที่ 8 ของประเทศไทย โดยการนำเทคนิควิธี ELISA มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ระดับ 17-OHP ในทารกแรกเกิด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 ถึง พ.ศ. 2561 เพื่อหาอุบัติการณ์การเกิดโรคและศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรวจคัดกรองในครั้งนี้

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นเป็นกลุ่มเดียวกับทารกแรกเกิดที่ตรวจคัดกรองโรคภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนและโรคฟีนิลคีโตนูเลีย ในรายที่มารดา บิดา และผู้ปกครอง ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย บุคลากรทางการแพทย์ของสถานพยาบาลใน 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี สกลนคร นครพนม หนองบัวลำภู หนองคาย เลย และบึงกาฬ ได้ทำการบันทึกข้อมูลในใบประวัติ และเจาะเลือดทารกจากส้นเท้าหรือเส้นเลือดดำที่หลังมือ หยดลงบนกระดาษซับเลือด และนำกระดาษซับเลือดมาผึ่งตากให้แห้ง หลังจากนั้นส่งตัวอย่างมาที่สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับ 17–OHP จำนวนทั้งสิ้น 39,503 ราย เป็นทารกเพศชาย จำนวน 19,996 ราย เป็นทารกเพศหญิง จำนวน 19,492 ราย และไม่ได้ระบุเพศ จำนวน 15 ราย ทารกที่ได้รับการเจาะเลือดอายุ 48 –192 ชั่วโมง มีจำนวน 39,015 ราย ทารกที่ได้รับการเจาะเลือดอายุน้อยกว่า 48 ชั่วโมง มีจำนวน 488 ราย

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) รุ่น ELx 808 (BioTek, USA) สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง เครื่องบ่มเพาะเชื้อ (incubator) แบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส รุ่น 800 (Memmert, Germany) ตู้เย็น รุ่น Tiara (Mitsubishi, Japan) และกระดาษซับเลือดเบอร์ 903TM (Whatman, USA)

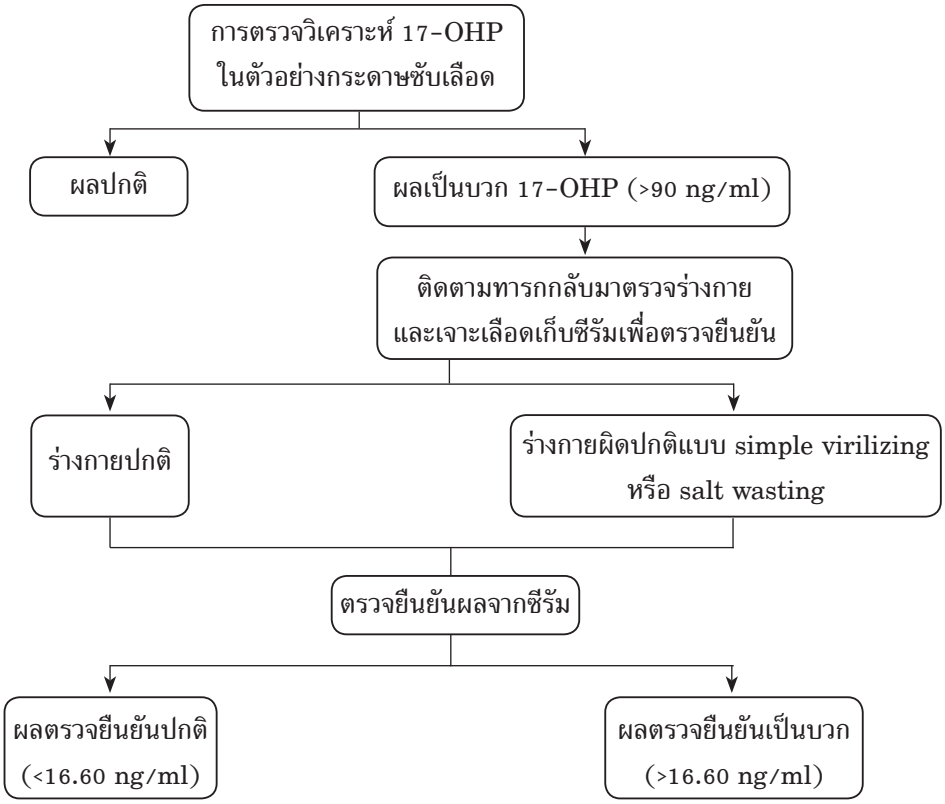
ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป สารมาตรฐาน

ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างกระดาษซับเลือด ELIZEN Neonatal 17-OHP Screening (ZenTech s.a., Belgium) ประกอบด้วย 96 well strips plate ที่เคลือบด้วย anti-17-OHP, สารมาตรฐานและสารควบคุมคุณภาพ, 100x conjugated ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase, น้ำยาสำหรับสกัดเลือดจากกระดาษซับเลือดแห้ง (extraction buffer), น้ำยาสำหรับล้างเพลท (washing solution), สารตั้งต้น (substrate) เพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (3,3',5,5' tetramethylbenzidine; TMB) และน้ำยาหยุดปฏิกิริยา (stop solution, H_2SO_4)

ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปในตัวอย่างซีรัม 17-OHP Progesterone (NOVATEC IMMUNDIAGNOSTICA GMBH, Germany) ประกอบด้วย 96 well strips plate ที่เคลือบด้วย anti-17-OHP, สารมาตรฐานและสารควบคุมคุณภาพ, 17-OHP conjugate ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase, น้ำยาสำหรับล้างเพลท (washing solution), สารตั้งต้น (substrate) เพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (3,3',5,5' tetramethylbenzidine; TMB) และน้ำยาหยุดปฏิกิริยา (stop solution, H_2SO_4)

วิธีการ

การดำเนินการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดโรค CAH เพื่อตรวจวิเคราะห์ 17-OHP โดยวิธี ELISA ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การดำเนินงานการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดโรค CAH ในเขตสุขภาพที่ 8 อุดรธานี ที่ส่งตัวอย่างกระดาษซับเลือดและซีรัมมาตรวจวิเคราะห์ค่า 17-OHP ณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

ขั้นตอนการดำเนินงานตรวจระดับ 17-OHP

การตรวจวิเคราะห์ระดับ 17-OHP ในตัวอย่างกระดาษซับเลือด โดยตัดตัวอย่างกระดาษซับเลือด สารมาตรฐาน และสารควบคุมคุณภาพ ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 3.0 มิลลิเมตร ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ 17-OHP เติมน้ำยาสำหรับสกัดเลือดจากตัวอย่างกระดาษซับเลือดที่มีส่วนผสมของแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน นำเพลทมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ 4 ครั้ง และทำให้แห้ง เติมซับสเตรท (substrate, TMB) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก (0.5 M H_2SO_4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร หากตัวอย่างมีค่า > 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ติดตามเด็กกลับมาเก็บซีรัมเพื่อตรวจยืนยันต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ยืนยันผลในตัวอย่างซีรัม โดยเติม 25 ไมโครลิตร ของตัวอย่างซีรัม สารมาตรฐาน และสารควบคุมคุณภาพ อย่างละ 2 หลุม ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ 17-OHP เติมบัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง และทำให้แห้ง เติมซับสเตรท (substrate, TMB) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก (0.5 M H_2SO_4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

การแปลผล

การตรวจคัดกรอง 17-OHP ในตัวอย่างกระดาษซับเลือด ถ้ามีค่า cutoff > 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลเป็นบวก[8] และการตรวจยืนยันผลในตัวอย่างซีรัม ถ้ามีค่า cutoff > 16.60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลเป็นบวก[3]

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษานี้ใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และสถิติเชิงวิเคราะห์ โดยใช้ T-Test, Kruskal-Wallis Test ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวแปรต่าง ๆ โดยมีระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant) ที่ p-value < 0.05

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้ได้ขอความยินยอมจากผู้ปกครองทารกแรกเกิด เพื่อเจาะเลือดเก็บตัวอย่างมาทำการศึกษาวิจัย และได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในมนุษย์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสโครงการ 001/2559

ผล

จากการรวบรวมข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ระดับ 17-OHP ด้วยวิธี ELISA ในกลุ่มตัวอย่างกระดาษซับเลือดของทารกแรกเกิดทั้งหมด 39,503 ราย พบว่าผลการตรวจคัดกรองที่เป็นปกติ มีจำนวนทั้งสิ้น 39,469 ราย ซึ่งเป็นเพศชาย จำนวน 19,977 ราย (50.57%) เพศหญิง จำนวน 19,477 ราย (49.31%) ผลจากกระดาษซับเลือดเป็นบวก มีจำนวนทั้งสิ้น 34 ราย (0.09%) เป็นเพศชาย 19 ราย (0.05%) เพศหญิง 15 ราย (0.04%) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การตรวจวิเคราะห์ระดับ 17-OHP ในตัวอย่างกระดาษซับเลือดของทารกแรกเกิด มีค่า cutoff > 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการตรวจคัดกรอง	เพศ	ค่า 17-OHP จากตัวอย่างกระดาษซับเลือด			
		จำนวนราย (ร้อยละ)	ค่าเฉลี่ย (ng/ml)	S.D.	p-value
ผลปกติ	ชาย	19,977 (50.57)	14.63	9.253	0.001
	หญิง	19,477 (49.30)	12.94	8.750	
	ไม่ระบุ	15 (0.04)	12.14	5.734	
ผลบวก	ชาย	19 (0.05)	112.25	18.021	0.410
	หญิง	15 (0.04)	117.81	20.777	
	รวม	**39,503 (100)**	**53.954**	**12.507**	

ดำเนินการติดตามทารกกลับมาตรวจร่างกายและเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างซีรัมสำหรับตรวจยืนยันผลได้จำนวน 33 ราย มี 1 ราย ที่ไม่สามารถเจาะเลือดเก็บตัวอย่างซีรัมได้เนื่องจากเป็นทารกป่วย และพบว่า 20 ราย มีผลการตรวจยืนยันตัวอย่างซีรัมเป็นบวก เป็นเพศชาย 11 ราย (33.33%) เพศหญิง 9 ราย (27.27%) และ 13 ราย (39.39%) มีผลการตรวจยืนยันซีรัมเป็นปกติ โดยเป็นเพศชาย 8 ราย (24.24%) เพศหญิง 5 ราย (15.15%) ดังแสดงในตารางที่ 2

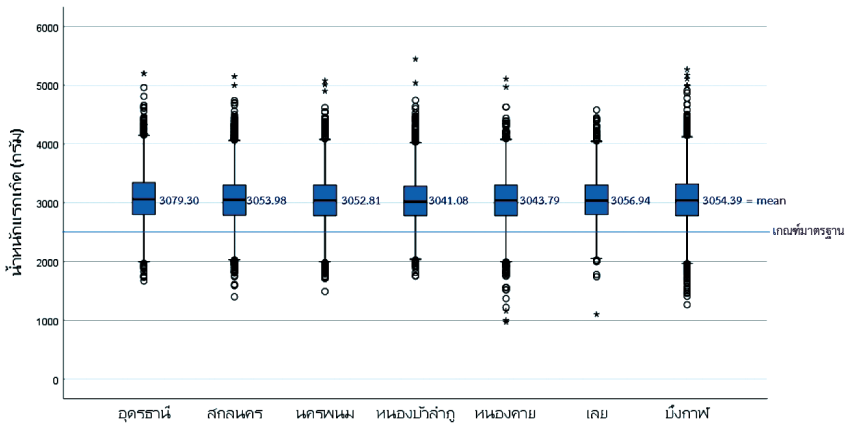
ตารางที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ระดับ 17-OHP ในตัวอย่างซีรัมของทารกแรกเกิดมีค่า cutoff > 16.60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการตรวจคัดกรอง	เพศ	ค่า 17-OHP จากตัวอย่างซีรัม			
		จำนวนราย (ร้อยละ)	ค่าเฉลี่ย (ng/mL)	S.D.	p-value
ผลปกติ	ชาย	8 (24.24)	10.42	3.340	0.469
	หญิง	5 (15.15)	12.26	5.220	
ผลบวก	ชาย	11 (33.33)	27.84	8.070	0.117
	หญิง	9 (27.27)	45.61	34.900	
	รวม	**33 (100)**	**24.03**	**12.882**	

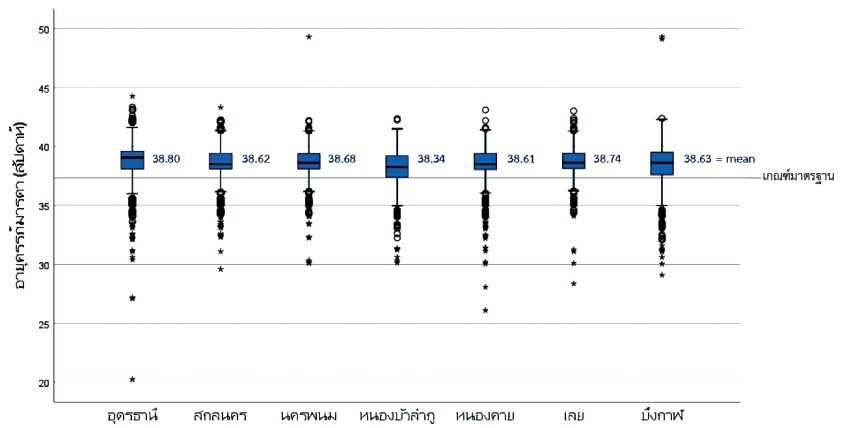
การตรวจร่างกายทารกที่มีผลการคัดกรองเป็นบวก ไม่พบอาการเสียเกลือและน้ำ หรืออวัยวะเพศกำกวม และการตรวจซีรัมอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ได้แก่ โซเดียม โพแตสเซียมคลอไรด์ และไบคาร์บอเนต มีผลปกติ

เมื่อนำข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างกระดาษซับเลือดมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักแรกเกิดและค่าเฉลี่ยอายุครรภ์มารดาของแต่ละจังหวัด พบว่าค่าเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ปกติขององค์การอนามัยโลก คือ มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแรกเกิด ≥ 2,500 กรัม และค่าเฉลี่ยอายุครรภ์มารดา ≥ 37 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 2

ก)



ข)



ภาพที่ 2 ก) น้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย (กรัม) ของทารกแรกเกิดที่ได้รับการตรวจคัดกรองใน 7 จังหวัด
ข) อายุครรภ์มารดาเฉลี่ย (สัปดาห์) ของทารกแรกเกิดที่ได้รับการตรวจคัดกรองใน 7 จังหวัด

นำตัวอย่างกระดาษซับเลือด จำนวน 39,113 แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ตามอายุครรภ์มารดา (คัดแยกตัวอย่างที่ไม่ได้ระบุอายุครรภ์มารดาออก) โดยอายุครรภ์มารดาที่ < 37 สัปดาห์ เป็นเด็กที่คลอดก่อนกำหนด พบว่ามีค่ามัธยฐานของ 17-OHP สูงกว่าทารกแรกเกิดที่คลอดตามกำหนด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนค่ามัธยฐาน 17-OHP ของกลุ่มตัวอย่างคัดกรองเป็นบวกไม่แตกต่างกัน ($p = 0.33$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบค่ามัธยฐานของ 17-OHP ในกลุ่มตัวอย่างตรวจคัดกรองปกติ แบ่งตามอายุครรภ์มารดา

อายุครรภ์ (สัปดาห์)	จำนวนทารกแรกเกิด (ร้อยละ)	ค่ามัธยฐาน* 17-OHP (ng/ml)	ค่าพิสัย 17-OHP (ng/ml)
<34	105 (0.26)	23.35a	3.19 – 88.55
34 – <37	2,495 (6.38)	14.86b	0.00 – 88.25
37 – <40	29,483 (75.38)	11.96b	0.00 – 88.80
40 – <43	7,019 (17.95)	10.75b	0.00 – 84.70
≥43	11 (0.03)	10.05b	0.00 – 35.52
รวม	**39,113 (100)**	-	-

*ค่ามัธยฐานของ 17-OHP ใน column เดียวกัน ตามด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่ามัธยฐานของ 17-OHP ในกลุ่มตัวอย่างตรวจคัดกรองเป็นบวก แบ่งตามอายุครรภ์มารดา

อายุครรภ์ (สัปดาห์)	จำนวนทารกแรกเกิด (ร้อยละ)	ค่ามัธยฐาน* 17-OHP (ng/ml)	ค่าพิสัย 17-OHP (ng/ml)
<34	11 (32.35)	118.18a	91.85 – 158.98
34 – <37	15 (44.12)	110.60a	93.71 – 130.85
37 – <40	6 (17.65)	97.64a	94.56 – 124.66
40 – <43	2 (5.88)	126.18a	106.87 – 145.50
≥43	-	-	-
รวม	34 (100)	-	-

*ค่ามัธยฐานของ 17-OHP ใน column เดียวกัน ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกัน (Kruskal-Wallis Test, $p > 0.05$)

แบ่งตัวอย่างกระดาษซับเลือดจากทารก จำนวน 39,369 ราย เป็น 5 กลุ่ม ตามน้ำหนักแรกเกิด (คัดแยกตัวอย่างที่ไม่ได้ระบุน้ำหนักแรกเกิดออก) โดยน้ำหนักแรกเกิด < 2,500 กรัม เป็นทารกที่มีน้ำหนักแรกเกิดต่ำกว่าเกณฑ์ พบว่ามีค่ามัธยฐานของ 17-OHP ในกลุ่มตัวอย่างตรวจคัดกรองปกติ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 5 ส่วนค่ามัธยฐาน 17-OHP ของกลุ่มตัวอย่างคัดกรองเป็นบวกไม่แตกต่างกัน ($p = 0.17$) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างค่ามัธยฐานของ 17-OHP ในกลุ่มตัวอย่างตรวจคัดกรองปกติ แบ่งตามน้ำหนักแรกเกิด

อายุครรภ์ (สัปดาห์)	จำนวนทารกแรกเกิด (ร้อยละ)	ค่ามัธยฐาน* 17-OHP (ng/ml)	ค่าพิสัย 17-OHP (ng/ml)
<2000	171 (0.43)	17.61a	1.87 - 88.55
2000 – 2500	2,776 (7.05)	13.15b	0.00 – 88.25
2501 – 3000	15,209 (38.63)	11.84b	0.00 – 84.25
3001 – 3500	16,250 (41.28)	11.72b	0.00 – 88.80
>3500	4,963 (12.61)	11.90b	0.00 - 86.35
รวม	39,369 (100)	-	-

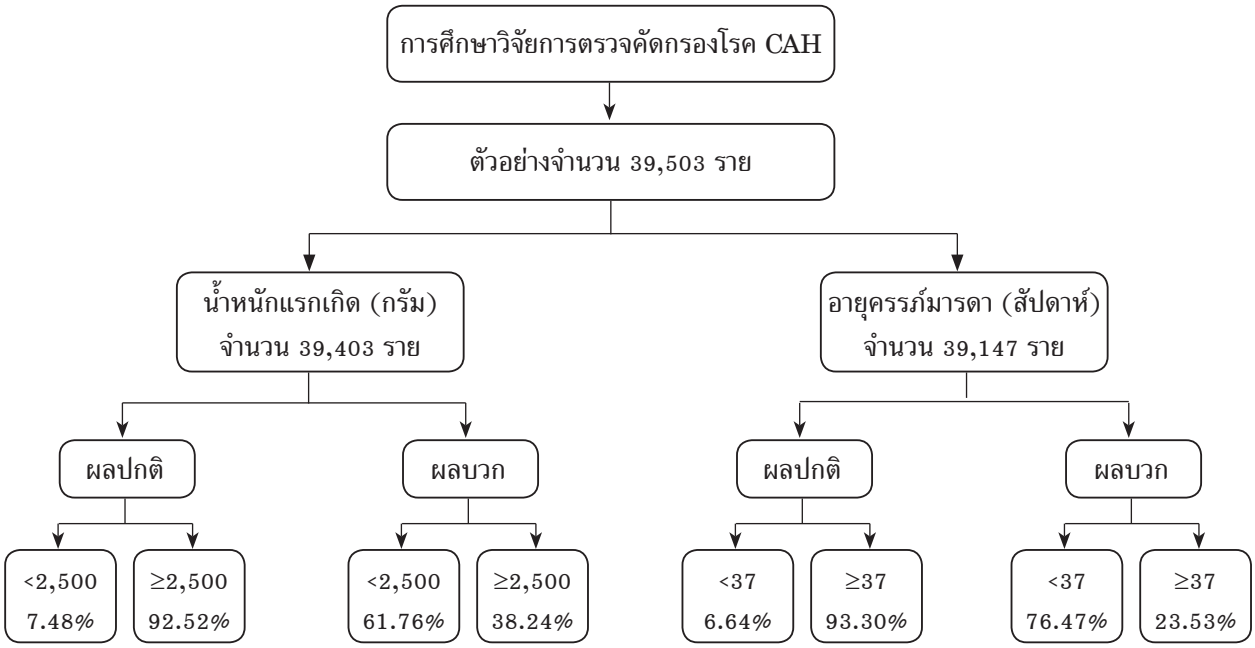
*ค่ามัธยฐานของ 17-OHP ใน column เดียวกัน ตามด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis Test, $p < 0.05$)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างค่ามัธยฐานของ 17-OHP ในกลุ่มตัวอย่างตรวจคัดกรองเป็นบวก แบ่งตามน้ำหนักแรกเกิด

อายุครรภ์ (สัปดาห์)	จำนวนทารกแรกเกิด (ร้อยละ)	ค่ามัธยฐาน* 17-OHP (ng/ml)	ค่าพิสัย 17-OHP (ng/ml)
<2000	11 (32.35)	118.18a	91.85 - 158.98
≥2000 – 2500	10 (29.41)	110.80a	93.71 - 124.66
≥2501 – 3000	10 (29.42)	102.89a	94.56 - 134.47
≥3001 – 3500	2 (5.88)	103.61a	95.07 – 112.16
≥3501	1 (2.94)	-	-
รวม	34 (100)	-	-

*ค่ามัธยฐานของ 17-OHP ใน column เดียวกัน ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกัน (Kruskal-Wallis Test, $p > 0.05$)

การตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดโรค CAH โดยการตรวจวิเคราะห์ระดับ 17-OHP ด้วยวิธี ELISA ในกลุ่มตัวอย่างกระดาษซับเลือดของทารกแรกเกิดทั้งหมด 39,503 ราย ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดโรค CAH ในตัวอย่างโดยอาศัยปัจจัยของน้ำหนักแรกเกิดและอายุครรภ์มารดา

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์เพื่อหาระดับ 17-OHP ในตัวอย่างกระดาษซับเลือดด้วยวิธี ELISA จำนวน 39,503 ราย จากสถานบริการสาธารณสุขเขตสุขภาพที่ 8 อุดรธานี จาก 7 จังหวัด ในระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อระดับ 17-OHP ที่สูงผิดปกติ มี 2 ประเด็น คือ อายุครรภ์มารดา และน้ำหนักแรกเกิดที่ต่ำกว่าเกณฑ์ ซึ่งจากผลการตรวจกระดาษซับเลือด พบผลผิดปกติ 34 ราย ได้ติดตามกลับมาตรวจร่างกายและเก็บตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจยืนยันได้ 33 ราย มีผลผิดปกติ จำนวน 20 ราย คิดเป็นอุบัติการณ์เท่ากับ 1: 1,975 โดยเป็นผลปกติ 13 ราย ซึ่งเป็นผลบวกปลอม คิดเป็นร้อยละ 39.39 แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างกลุ่มผลบวกปลอมนี้มีอายุครรภ์มารดาและน้ำหนักแรกเกิดต่ำกว่าเกณฑ์ คือ อายุครรภ์ < 37 สัปดาห์ น้ำหนัก < 2,500 กรัม และมีค่ามัธยฐานของระดับ 17-OHP สูงในทารกแรกเกิดที่มีน้ำหนักแรกเกิดและอายุครรภ์มารดาต่ำกว่าเกณฑ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

ทารกที่ตรวจคัดกรองและมีผลปกติจำนวนมากกว่า 90% โดยมีการคลอดตามอายุครรภ์ปกติและน้ำหนักตัวเป็นไปตามเกณฑ์ ในขณะที่รายที่มีผลบวก ค่า 17-OHP สูง มีความสัมพันธ์กับการคลอดก่อนกำหนดมากกว่า 70% และมีน้ำหนักตัวต่ำกว่าเกณฑ์ร่วมด้วยกว่า 60% ซึ่งอาจเป็นเพราะอายุครรภ์เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการเกิดต่อมหมวกไตของทารกในครรภ์ จึงมีแนวโน้มที่จะมีความเสี่ยงของการเกิดโรคสูงในรายที่มีอายุครรภ์และน้ำหนักตัวไม่เป็นไปตามเกณฑ์[13]

สำหรับการกำหนดค่า cutoff ของระดับ 17-OHP จากกระดาษซับเลือดในการศึกษานี้ ใช้ค่าจากการศึกษาของ กิตติภพ และคณะ, 2551[8] เนื่องจากเป็นค่าที่ได้จากการศึกษาในเด็กไทย แต่การตรวจยืนยันผลจากซีรัมยังไม่มีการรายงานในประเทศ จึงใช้ค่าที่อ้างอิงจากการศึกษาของ Ibrahem และคณะ[3] ซึ่งเป็นการกำหนดค่าตามเกณฑ์ของอายุครรภ์มารดาหรือน้ำหนักแรกเกิดที่ในต่างประเทศทั่วโลกนำมาใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินในการติดตามเด็กกลับมาตรวจยืนยันผล และทำให้การตรวจคัดกรองให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น[15]

การนำเทคนิค ELISA มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์นี้เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้งบประมาณน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ มีความพร้อมของเครื่องมือ อุปกรณ์ และชุดทดสอบ มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งพบว่ามีจำหน่าย 8 ยี่ห้อ แต่มีเพียง 1 ยี่ห้อ ที่มีตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย เนื่องจากยังไม่มีการตรวจคัดกรองโรคในประเทศ จึงทำให้มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป ซึ่งในอนาคตจะพัฒนาวิธีตรวจคัดกรองแบบอื่นที่มีความจำเพาะและความไวมากขึ้น เช่น Time-Resolved Fluorescence Immunoassay (DELFIA), Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS) และ Molecular genetic analysis เป็นต้น สำหรับการพบผลบวกปลอมนั้นมีโอกาสเกิดได้จากการวิเคราะห์ทั้งจากวิธี ELISA และวิธีอื่น เช่น จากการศึกษาการตรวจคัดกรองโรค CAH ของ นภวรรณ และคณะ, 2542 ตรวจวิเคราะห์ 17-OHP จากตัวอย่างกระดาษซับเลือด และการศึกษาของ กิตติภพ และคณะ, 2551 ซึ่งใช้วิธี RIA และ DELFIA พบผลบวกปลอมร้อยละ 95.59 และ 50.00 ตามลำดับ การตรวจคัดกรองโรคนี้ในประเทศอื่น ๆ พบปัญหาเช่นเดียวกัน มีการวิเคราะห์สาเหตุของผลบวกปลอมว่ามาจากความจำเพาะของแอนติบอดีไม่ดี อาจจะมีการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารประกอบสเตียรอยด์อื่น ๆ ในกระดาษซับเลือด และเกิดจากทารกคลอดก่อนกำหนด น้ำหนักแรกเกิดน้อย มีภาวะเครียดหลังคลอด และมีอาการเจ็บป่วย[13]

ปัจจุบันไม่มีการตรวจคัดกรองโรคนี้ในประเทศไทยเนื่องจากยังไม่ได้บรรจุอยู่ในระบบของประเทศ ดังนั้นการพิจารณาจากการคลอดก่อนกำหนดและน้ำหนักแรกเกิดที่น้อยกว่าเกณฑ์เป็นประโยชน์ต่อแพทย์ที่จะพิจารณาส่งทารกที่มีแนวโน้มของการเกิดโรคนี้ให้ได้รับการตรวจวินิจฉัยโดยเร็ว (early detection) เพื่อให้สามารถทำการรักษาโรคได้ทันเวลา แม้ร่างกายปกติแต่พบการสูญเสียน้ำและเกลือก็จะได้รับการรักษาทันที แต่ในรายที่ไม่พบการสูญเสียน้ำและเกลือรวมทั้งตรวจไม่พบทันท่วงที เด็กอาจจะเสียชีวิตในระยะเวลาต่อมาถ้าไม่ได้รับการตรวจคัดกรองโรคนี้ตั้งแต่แรกเกิด

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานำร่องเพื่อพัฒนาการตรวจคัดกรองเพื่อหาอุบัติการณ์การเกิดโรคในทารกแรกเกิดนี้ มีการยินยอมเข้าร่วมโครงการตามหลักจริยธรรมการวิจัยจากมารดา บิดา และผู้ปกครองของทารก เพียงร้อยละ 64.57 ของทารกแรกเกิดที่ตรวจคัดกรองโรคภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมน และโรคฟีนิลคีโตนูเลีย จึงทำให้ไม่สามารถทำการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิดได้ทุกรายในพื้นที่ที่ทำการศึกษา ซึ่งจำนวนที่ขาดหายไปนั้นอาจมีทารกที่เป็นโรคแฝงอยู่

ผลของการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อระบบการสาธารณสุขของประเทศ ทำให้ทราบปัญหา อุปสรรค และปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคภาวะบกพร่องฮอร์โมนต่อมหมวกไตแต่กำเนิด สามารถนำมาแก้ไขและปรับปรุงพัฒนาระบบการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิดเป็นประโยชน์ต่อประชาชนทั่วไป รวมทั้งเป็นข้อมูลนำเข้าสำหรับการวางแผนและกำหนดนโยบายในการแก้ไขปัญหาระบบสาธารณสุขในระดับประเทศในเรื่องโรคภาวะบกพร่องฮอร์โมนต่อมหมวกไตแต่กำเนิด

สรุป

ผลการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 พบว่าทารกในกลุ่มที่มีผลการตรวจวิเคราะห์ 17-OHP เป็นบวก แม้ไม่พบทารกแรกเกิดที่มีอาการของโรคแบบรุนแรง แต่มีระดับ 7-OHP สูงกว่าเกณฑ์ มีโอกาสเสี่ยงสูงในการเกิดโรคภาวะบกพร่องฮอร์โมนต่อมหมวกไตแต่กำเนิด โดยมีปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้อง คือ การคลอดก่อนกำหนด (อายุครรภ์ <37 สัปดาห์) และน้ำหนักทารกแรกเกิดต่ำกว่าเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ (<2,500 กรัม) สูงถึงร้อยละ 76.47 และ 61.76

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทีมงานวิจัยการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิดทุกท่าน ท่านผู้บริหารและผู้อำนวยการสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลการศึกษาวิจัยโครงการศึกษานำร่องโรค CAH คุณประสงค์ ศรีแสงฉาย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้การปรึกษาหารือการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ผู้ทรงคุณวุฒิ คุณวิชชุดา จริยะพันธ์ สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ ดร.สิริพรรณ แสงอรุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตรสาธารณสุข ที่ให้คำปรึกษาในการเขียนบทความในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Tsuji A, Konishi K, Hasegawa S, Anazawa A, Onishi T, Ono M, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Tokyo, Japan from 1989 to 2013: a retrospective population-based study. BMC Pediatr 2015; 15: 209. (8 pages).
2. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95(9): 4133-60.
3. Sheikh Alshabab LI, AlebrahIm A, Kaddoura A, Al-Fahoum S. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: a five-year retrospective study in the Children's Hospital of Damascus, Syria. Qatar Med J 2015; 2015(1): 11. (6 pages).
4. Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenström A. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. JAMA Pediatr 2014; 168(6): 567-74.
5. Morikawa S, Nakamura A, Fujikura K, Fukushi M, Hotsubo T, Miyata J, et al. Results from 28 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Sapporo. Clin Pediatr Endocrinol 2014; 23(2): 35-43.
6. Reviews of inborn errors of metabolism. In: Seymour CA, Thomason MJ, Chalmers RA, Addison GM, Bain MD, Cockburn F, et al. Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review. Health Technol Assess. 1997; 1(11): 9-35.
7. Janejai N, Krasao P, Phansang J, Pankarnjanato R, Charoensiriwatana W. Congenital adrenal hyperplasia: should nationwide screening be implemented in Thailand? Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003; 34(Suppl 3): 170-3.
8. Somboonnithiphol K, Panamonta O, Kiatchoosakun P, Jirapradittha J, Panamonta M, Lumbiganon P, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Srinagarind Hospital, Khon Khaen University Thailand. Asian Biomed 2011; 5(6): 855-9.
9. Nimkarn S, Likitmaskul S, Sangacharoenkit P, Pathomvanich A, Sawathiparnich P, Wacharasindhu S, et al. Ambiguous genitalia: an overview of 22 years experience and the diagnostic approach in the Pediatric Department, Siriraj Hospital. J Med Assoc Thai 2002; 85(Suppl 2): S496-505.
10. Bunraungsak S, Klomchan T, Sahakitrungruang T. Growth pattern and pubertal development in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. Asian Biomed 2013; 7(6): 787-94.

11. Jaruratanasirikul S, Thongseiratch T. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia: 20-years experience in Songklanagarind Hospital. J Med Assoc Thai 2013; 96(3): 288-93.
12. อำนาจ วงษ์สุวรรณ. การศึกษาผู้ป่วย Congenital Adrenal Hyperplasia ในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ระหว่าง พ.ศ. 2533-2538. [วิทยานิพนธ์]. แพทย์เฉพาะทาง สาขากุมารเวชศาสตร์. กรุงเทพฯ: สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี; 2540.
13. Pearce M, DeMartino L, McMahon R, Hamel R, Maloney B, Stansfield DM, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State. Mol Genet Metab Rep 2016; 7: 1-7.
14. Kopacek C, de Castro SM, Prado MJ, da Silva CM, Beltrão LA, Spritzer PM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Southern Brazil: a population based study with 108,409 infants. BMC Pediatr 2017; 17(1): 22. (7 pages).
15. van der Kamp HJ, Oudshoorn CG, Elvers BH, van Baarle M, Otten BJ, Wit JM, et al. Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(7): 3904-7.

Study of Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydrxylase Deficiency in the Upper Northeastern Area of Thailand

Sawittree Nakprasit[1] Sumonta Chaisomchita[1] Boonipa Songkhram[2] Walaiporn Rojsanga[3] and Kevalee Unachak[4]

[1]*Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000*

[2]*Regional Medical Sciences Center 8 Udonthani, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang, Udonthani 41000*

[3]*Udonthani Hospital, Amphoe Mueang, Udonthani 41000*

ABSTRACT Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is an autosomal recessive disorder due to 21-hydroxylase deficiency leading to salt wasting symptoms and ambiguous genitalia in affected female. The patients will have high mortality if not receiving proper treatments in a timely manner. This study was a pilot study of CAH screening in the Regional Health 8 office, Thailand to find the incidence and related factors affecting to the newborn screening. The 39,503 dried blood spot samples were collected and Neonatal 17α- Hydroxyprogesterone (17-OHP) Screening kit with ELISA technique was used to measure the 17-OHP level. There were 34 cases found positive and 33 of them were followed for confirmation test. Twenty cases found positive from serum samples testing but none of them was diagnosed with CAH. The results showed that newborn with positive screening test had average gestational age and birth weight were below WHO criteria 76.47% and 61.76% respectively. When compare the median 17-OHP of 5 groups of gestational age and 5 groups of birth weight, premature infants and under birth weight infants had higher 17-OHP values than mature and normal birth weight infants, the differences between the medians were significant $p < 0.001$. Therefore, the factors found related to 17-OHP levels were under birth weight, premature.

Keyword: Congenital Adrenal Hyperplasia, Screening, Dried blood spot, ELISA