

การพัฒนาการตรวจอย่างง่ายเพื่อหาพาหะ ของธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติ

สุภาพร คณะพญา

ร.พ. นครปฐม

ABSTRACT :

Kanapongsa S. Development of Screening Method for Carriers of Thalassemia and Abnormal Hemoglobin. (Region 7 Medical Journal 1994 ; 3 : 247-253.)

Department of Clinical Pathology, Nakornpathom Hospital, Thailand.

Thalassemia is a heredity disease that commonly found in Thailand, which the statistic is more than 10,000 people suffer from this disease each year. Prevention and control of disease can be performed through the screening process which should be easy, rapid, economic and reliable ; for example, the red cell osmotic fragility test and the diclorophenolindophenal precipitation test which using Capillary pipette replace with Autopipette. The sensitivity and specificity of this process were compared to the standard method by hemoglobin electrophoresis and percentage of hemoglobin A₂ which found the values of 100% and 97.9%, respectively. The false positive was 1.4% and the false negative was 0.0%. The prevalence of thalassemia in a group of 210 pregnant women at Nakornpathom Hospital was 31.9%. The abnormalities were hemoglobin E trait 17.6%, homozygous hemoglobin E 6.7%, β -thalassemia 7.1% and α -thalassemia 0.5%. The uses of Capillary pipette is as effective as Autopipette because both of them give the same result, but Capillary pipette is cheaper. In conclusion, the techniques of this screening process were easily proved to be simple, rapid, reliable and be suited for every hospitals in a field work.

บทคัดย่อ :

สุภาพร คณะพวงษา. การพัฒนาการตรวจอย่างง่ายเพื่อหาพาหะของธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติ. (วารสาร แพทย์เขต 7 2537 ; 3 : 247-253.)

กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก, ร.พ. นครปฐม

ธาลัสซีเมียเป็นโรคพันธุกรรมที่พบได้บ่อยที่สุดในคนไทย ในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมียที่สำคัญชนิดใดชนิดหนึ่งกว่า 10,000 คน การดูแลรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ต้องใช้ทรัพยากรของประเทศมากมาย จัดได้ว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอันหนึ่งของประเทศ จึงต้องหาทางควบคุมป้องกันโรคนี้ ด้วยวิธีการตรวจอย่างง่ายรวดเร็วและประหยัดได้ผลดี ทำการทดสอบหาความเปราะของเม็ดเลือดแดง โดยใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.36% และตรวจหาฮีโมโกลบินผิดปกติโดยใช้สารละลายสีโคคลอฟินอลอินโดฟีนอล โดยใช้ Capillary pipette แทน Autopipette และนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจมาตรฐานด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส หาเปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบินเอ - สอง การตรวจวิธีเบื้องต้น มีความไว 100% ความจำเพาะ 97.9% ผลบวกหลง 1.4% ผลลบหลง 0.0% ได้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโลหิตผู้ที่มาฝากครรภ์ในโรงพยาบาลศูนย์นครปฐม จำนวน 210 ราย ผลปรากฏว่ามีความชุก 31.9% เป็นพาหะของฮีโมโกลบิน ดี 17.6%, ฮีโมโกลบินอีอี 6.7%, เบต้า - ธาลัสซีเมีย 7.1%, แอลฟา - ธาลัสซีเมีย 0.5% การใช้ Capillary pipette แทน Autopipette นั้นได้ผลตรงกัน แต่ลดค่าใช้จ่ายได้มาก เพราะ Capillary pipette มีราคาถูกและมีใช้ในห้องปฏิบัติการทุกแห่ง เมื่อเปรียบเทียบกับ Autopipette ที่มีราคาค่อนข้างแพง ในห้องปฏิบัติการบางแห่งยังไม่มีใช้ ซึ่งวิธีการตรวจอย่างง่ายนี้เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในโรงพยาบาลชุมชนได้ทุกแห่ง

บทนำ

โรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติอื่น ๆ เป็นโรคที่พบบ่อยในประเทศไทยถ่ายทอดทางพันธุกรรม เม็ดเลือดแดงสร้างสายฮีโมโกลบินน้อยลงหรือไม่สร้างเลย ส่วนฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของสายโกลบิน ถึงแม้ธาลัสซีเมียเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นมาแต่กำเนิด นอกจากการให้การรักษาล่วงหน้าจะต้องแนะนำให้ผู้ป่วยและครอบครัวเข้าใจและมีความรู้เกี่ยวกับโรคนี้ ตลอดจนแนะนำให้คำแนะนำปรึกษาทางพันธุกรรม ผู้ป่วยส่วนมากจะซีด ตาเหลือง และยังมีภาวะแทรกซ้อนอีกหลายประการ เช่น ตับ, ม้ามโต, ตัวเล็ก, ต่อมไทรอยด์โต, มีนิ่วในถุงน้ำดี หรือถุงน้ำดีอักเสบปริมาณเหล็กในร่างกายเกิน ทำให้เกิดอาการของโรคฮีโมโครมาโตซิส ผู้ป่วยมักจะเบื่ออาหาร ผอมลง ผิวคล้ำมากขึ้น การวินิจฉัยก่อนคลอด อาจทำได้โดยการวัดการสังเคราะห์โกลบิน หรือการตรวจเซลล์ในน้ำคร่ำ จะสามารถวินิจฉัยทารกในครรภ์ว่าเป็นธาลัสซีเมียหรือไม่ ซึ่งในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมียมากกว่า 10,000 คน การดูแลผู้ป่วยเหล่านี้ต้องใช้ทรัพยากรของประเทศทั้งกำลังคนและกำลังทรัพย์มากมาย จัดได้ว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอันหนึ่งของประเทศ

การตรวจโรคดังกล่าว จำเป็นจะต้องใช้การตรวจเบื้องต้นที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และทำได้ในโรงพยาบาลทุกแห่ง นำประชากรที่สงสัยมาตรวจหาชนิดของยีนผิดปกติด้วยวิธีมาตรฐาน เพื่อประโยชน์ในการรักษาและคำปรึกษาทางพันธุกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจอย่างง่ายในการตรวจหาพาหะของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ
2. เพื่อศึกษาความถูกต้องของพาหะธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในหญิงมีครรภ์

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มหญิงมีครรภ์ที่มาฝากครรภ์ในแผนกสูติ-นรีเวช

โรงพยาบาลศูนย์นครปฐมโดยสุ่มตัวอย่างมาจำนวน 210 ราย โดยเจาะเลือดจากกลุ่มตัวอย่างจำนวน 5 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ EDTA

วิธีการตรวจเบื้องต้นมี 2 วิธี

1. การตรวจหาความเปราะของเม็ดเลือดแดง (one - tube osmotic fragility test, OF) เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะมีความเปราะน้อยกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ วิธีนี้สามารถแยกเม็ดเลือดแดงของคนปกติกับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย เพราะเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะสามารถสภาพได้โดยไม่แตก

วิธีการตรวจ

- 1.1 โดยใช้ไปเปตดูดเลือด (EDTA) จำนวน 20 ul ใส่ในหลอดที่บรรจุ 0.36% buffered saline solution ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 4 นาที

- 1.2 โดยใช้ Capillary pipette (Hematocrit tube) หยดเลือด 1 หยด

- หลอดที่มีสารละลายสีแดงใส แสดงว่าผลลบ
- หลอดที่มีสารละลายขุ่น แสดงว่าผลบวก

2. การตรวจหาฮีโมโกลบินผิดปกติ โดยใช้สารละลายของซีโอดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล วิธีนี้สามารถตรวจหา HbE (ทั้ง Homozygous และ Heterozygous HbH disease และ thalaseemia HbE disease) วิธีการตรวจ

- 2.1 บั่นเลือด EDTA แยกพลาสมาออก ใช้ไปเปตดูดส่วนที่เป็นเม็ดเลือดแดง 20 ul ใส่หลอดที่บรรจุ DCIP ผสมให้เข้ากันนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

- 2.2 ใช้ Capillary pipette (Hematocrit tube) ใส่เลือด 2 หยด ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

- หลอดที่มีสารละลายใส สีเขียวน้ำเงิน แสดงว่าผลลบ

ตารางที่ 1 ผลของ Osmotic fragility test (OF) ในกลุ่ม
หญิงมีครรภ์โดยใช้ Capillary tube

ผล OF	จำนวน	%
Negative	150	71.4
Positive	60	28.5
- HbE trait	28	13.3
- Homozygous HbE	14	6.7
- β - Thal trait	15	7.1
- Normal ($HbA_2 < 3.5\%$)	3	1.4

ตารางที่ 2 ผลของ Osmotic fragility test (OF) ในกลุ่ม
หญิงมีครรภ์โดยใช้ Autopipette

ผล OF	จำนวน	%
Negative	150	71.4
Positive	60	28.5
- HbE trait	28	13.3
- Homozygous HbE	14	6.7
- β - Thal trait	15	7.1
- Normal ($HbA_2 < 3.5\%$)	3	1.4

ตารางที่ 3 ผลของ Dichlorophenolindophenol test
(DCIP) โดยใช้ Capillary tube

ผล DCIP	จำนวน	%
Negative	158	75.2
Positive	52	24.8
- HbE trait	37	17.6
- Homozygous HbE	14	6.7
- α - Thal (HbH)	1	0.5

ตารางที่ 4 ผลของ Dichlorophenolindophenol test
(DCIP) โดยใช้ Autopipette

ผล DCIP	จำนวน	%
Negative	158	75.2
Positive	52	24.8
- HbE trait	37	17.6
- Homozygous HbE	14	6.7
- α - Thal(HbH)	1	0.5

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจ Thalassemia และ Abnormal Hemoglobin ในกลุ่มหญิงมีครรภ์

Genotype	จำนวน	%
HbE trait	37	17.6
Homozygous HbE	14	6.7
β - Thal trait	15	7.1
α - Thal(HbH)	1	0.5
Total	67	31.9

ตารางที่ 6 ผลของ OF และ DCIP ในกลุ่มหญิงมีครรภ์

กลุ่ม	OF	DCIP	จำนวน (%)	Genotype (%)
1	+	+	42 (20.0)	- HbE trait 28 (13.3)
2	+	-	18 (8.5)	- Homozygous HbE 14 (6.7)
3	-	+	10 (4.7)	- β - Thal trait 15 (7.1)
4	-	-	140 (66.7)	- Normal (HbA ₂ < 3.5%) 3(1.4)
				- HbE trait 9 (4.3)
				- α - Thal (HbH) 1 (0.5)
				- Normal 140 (66.7)

ตารางที่ 7 แสดงการคำนวณค่าความไว, ความจำเพาะ, ผลบวกหลงและผลลบหลงของการทดสอบ OF และ DCIP

Method		Standard Methods		Total
		Positive	Negative	
Screening test	Positive	67 TP	3 FP	70
	Negative	0 FN	140 TN	140
Total		67	143	210

$$\text{- Sensitivity} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 = 100\%$$

$$\text{- Specificity} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 = 97.9\%$$

$$\text{- False Positive} = \frac{FP}{TP+FP+TN+FN} \times 100 = 1.4\%$$

$$\text{- False Negative} = \frac{FN}{TP+FP+TN+FN} \times 100 = 0\%$$

- หลอดที่มีสารละลายยูน สี่เหลี่ยมเงิน มีตะกอนในสารละลาย แสดงว่าผลบวก

3. วิธีการตรวจมาตรฐาน

3.1 การหาชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธี Electrophoresis ใช้ Cellulose acetate เป็นแผ่น Membrane อาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้า

3.2 การหาเปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบิน A₂ ด้วยวิธี Microcolumn chromatography (Quik column Helena Laboratories Beaumont Texas) หาปริมาณ HbA₂ เป็นสิ่งสำคัญในการวินิจฉัยแยกโรคผู้ป่วยธาลัสซีเมียกับโรคโลหิตจางอื่น ๆ

ผลการทดลอง

เมื่อศึกษาในกลุ่มหญิงมีครรภ์จำนวน 210 ราย ด้วยวิธี OF โดยใช้ Capillary pipette พบว่า ได้ผลลบ 150 ราย (71.4%) ผลบวก 60 ราย (28.5%) วิธี OF โดยใช้ Autopipette ได้ผลลบ 150 ราย (71.4%) ผลบวก 60 ราย (28.5%) ในกลุ่มผลบวกพบความผิดปกติ 57 ราย (27.0%) (ตารางที่ 1, 2) เมื่อศึกษาด้วยวิธี DCIP พบว่า Capillary pipette ได้ผลลบ 158 ราย (75.2%) ผลบวก 52 ราย (24.8%) ใช้ Autopipette ได้ผลลบ 158 ราย (75.2%) และผลบวก 52 ราย (24.8%) เป็น HbE trait 37 ราย (17.6%) Homozygous HbE 14 ราย (6.7%) α -thal (HbH) 1 ราย (0.5%) (ตารางที่ 3, 4)

ผลการตรวจหาความชุกของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติของหญิงมีครรภ์ จำนวน 210 ราย ที่มาฝากครรภ์ พบว่ามีความชุก 31.9% แบ่งเป็น พาหะของ HbE 17.6%, Homozygous HbE 6.7% พาหะของ β -Thalassemia 7.1% , α -Thalassemia(HbH) 0.5%

วิจารณ์

ผลการตรวจทดลอง พบว่าการตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี OF และ DCIP โดยใช้ Capillary pipette (Hematocrit tube) และ Autopipette นั้นสามารถใช้แทนกันได้โดยให้

ผลเหมือนกัน ซึ่ง Capillary pipette นั้นมีราคาถูก หาได้ง่าย มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทุกแห่ง รวมทั้งโรงพยาบาลชุมชน แต่ Autopipette มีราคาค่อนข้างแพง การตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี OF และ DCIP สามารถแยกผู้ป่วยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติออกจากคนปกติได้ (ตารางที่ 6) โดยมีความไว 100% ความจำเพาะ 97.9% ผลบวกหลง 1.4% (ตารางที่ 7) ผลลบหลง 0.0% โรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย การสู่มตัวอย่างหญิงมีครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลศูนย์นครปฐม พบว่ามีความชุกถึง 31.9% (ตารางที่ 5) การตรวจด้วยวิธีมาตรฐานเครื่องมือจะซับซ้อน, มีราคาแพง และต้องใช้ความชำนาญ เวลาที่นานกว่าจะทราบผล จะเห็นได้ว่าการตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี OF และ DCIP โดยใช้ Capillary pipette แทน Autopipette จะสามารถทราบผลได้รวดเร็ว ว่า ผู้ป่วยเป็นโรคธาลัสซีเมียหรือไม่ และสามารถแยกชนิดของโรคโดยวิธีมาตรฐานต่อไป ซึ่งวิธีการตรวจเบื้องต้นใช้ต้นทุนน้อยและผลที่ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานแล้วปรากฏว่ามีผลตรงกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลศูนย์นครปฐม, ผู้อำนวยการกองพยาธิวิทยาคลินิก, คุณปริยา สุวรรณศิริ, น.พ.สมชาย แสงกิจพร, คุณปัทมาวดี ภูศิริ และคุณพิจิตร รัตนวิไลสกุล แห่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี ที่กรุณาให้คำแนะนำ พร้อมทั้งอุปกรณ์และน้ำยา

เอกสารอ้างอิง

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. Oxford : Blackwell scientific Publications, 1981.
2. Wasi P, Pootrakul S, Pootrakul P, Pravattmuang P, Winichagoon P, Fucharoen S. Thalassemia in Thailand. Ann NY Acad Sci 1980 ; 344 : 352-63.

3. WHO working group. Community control of hereditary anemias : memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 1983 ; 61 : 63-80.
4. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia Hemoglobin 1987 ; 11 : 65 - 88.
5. ทศน์ พุเจริญ. เอกสารเสนอในการประชุมคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญโรคธาลัสซีเมียของกระทรวงสาธารณสุข 18 พฤษภาคม 2532.
6. Suwankiri P, Sangkitpor S, Savahan S, Ratanavilaisakul P. Screening for carrier of Thalassemias and abnormal hemoglobin. Bull. Cu. Med Tech 1992 ; 5 : 982-991.
7. Kattamis C, Efremov G, Pootrakuls. Effectiveness of one - tube osmotic fragility screening in detecting - Thalassemia trait. J Med Genet 1981 ; 18 : 266-70.
8. Kulapongs P, Sanguanasersri T, Merty G, Tawarat S. Dichloropheno - lindophenol (DCIP) precipitation test : a new screening test of HbE and H. Paediatr Soc Thailand 1976 ; 15 : 1-7.
9. Wintrobe, Maxwell M. Clinical Hematology. 6th Ed. Le Febiger : Philadelphia, 1967.
10. อนงค์ เพียรภิจักรม. หนังสือการรักษาโรคทางโลหิตวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ เรือนแก้ว การพิมพ์, 2527.

พจก.ชมภูศรี เทรดิ่ง

จำหน่ายเครื่องมือและวัสดุการแพทย์ทุกชนิด

Tel. 02-4105916, 01-2113016

Phonelink 151, 152-453100