ชื่อผลงาน: การประยุกต์ใช้ EE score และ Mean Corpuscular Volume ในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E

คำสำคัญ: EE score, Mean Corpuscular Volume, Homozygous HbE, β^0-thalassemia/Hb E

ชื่อหน่วยงาน: งานเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมา

สมาชิกทีม: ***ทน.พญ. รวิวรรณ พวงพฤกษ์***, ทน.พญ.ปริพัส เนตรนี, ทน.พญ. ธิดาอุมา เอื้องคำประเสริฐ, น.ส. ศศิธร ใจชอบสันเทียะ, น.ส. เทพรัตน์ กำสันเทียะ, และ ดร.ทน.พญ. ยุพิน โจ้แปง

การติดต่อกับทีมงาน: ทน.พญ. รวิวรรณ พวงพฤกษ์, โทรศัพท์: 044-305136, E-mail: labhpc9@gmail.com

เป้าหมาย: เพื่อวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β–thalassemia/HbE โดยการประยุกต์ใช้ EE score และค่า Mean Corpuscular Volume

รูปแบบการนำเสนอ: Oral presentation

ปัญหาและสาเหตุโดยย่อ: ผู้ป่วย β^0-thalassemia/Hb E ส่วนใหญ่มีอาการรุนแรงมาก โดยมีอาการซีด อ่อนเพลีย ตัวเหลือง ม้ามโต เจริญเติบโตช้า ซึ่งต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือด (blood transfusion) และต้องได้รับยาขับธาตุเหล็กตลอดชีวิต ดังนั้นจึงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขที่ต้องมีการควบคุมและป้องกัน การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับโรค β^0-thalassemia/Hb E ได้แก่การตรวจกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียว (One tube osmotic fragility test: OF test)[1] และ/หรือการใช้ดัชนีเม็ดเลือดแดง[2-3] ร่วมกับการตรวจ HbE โดยการตกตะกอนด้วยสีดีซีไอพี (Dichlorophenol indolphenol (DCIP) precipitation) การตรวจยืนยัน β-thalassemia และ HbE จะตรวจโดยการหาปริมาณและชนิดของฮีโมโกลบิน (Hb Typing) โดยใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC), low-pressure liquid chromatography (LPLC), และ capillary electrophoresis (CE)[4-5]

ผู้ป่วย β^0-thalassemia/Hb E ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC สัดส่วนของ HbA_2/E = 30-60% และ HbF $\geq$ 20% ในขณะที่ผู้มีภาวะ Homozygous HbE ซึ่งไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย อาจมีอาการซีดเพียงเล็กน้อย มีสัดส่วนของ HbA_2/E $\geq$ 65% และ HbF < 5%[6] อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วย β^0-thalassemia/Hb E ส่วนหนึ่งที่มีสัดส่วนของ HbA_2/E > 75% และ HbF < 15%[7] ซึ่งพบบ่อยในห้องปฏิบัติการ และทำให้เกิดปัญหาในการแปลผล ถึงแม้ว่าในภาวะ Homozygous HbE จะพบ HbF ต่ำกว่า β^0-thalassemia/Hb E แต่มีความจำเป็นต้องตรวจยืนยันความผิดปกติถึงระดับดีเอ็นเอ สำหรับการตรวจวัดด้วยเทคนิค CE จะสามารถแยกชนิด HbA_2 ออกจาก HbE ได้ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา[8] พบว่าปริมาณ HbA_2 สามารถช่วยในการวินิจฉัย β^0-thalassemia/Hb E ออกจากภาวะ Homozygous HbE ได้ โดยใช้สิ่งที่ผู้วิจัยเรียกว่า EE score ซึ่งสูตรในการคำนวณ EE score = $7.3HbA_2$+HbF กรณี EE score$\leq$60 แปลผลเป็น Homozygous HbE ถ้า EE score>60 แปลผลเป็น β^0-thalassemia/Hb E แต่มีข้อจำกัดต้องใช้ตัวอย่างเลือดที่เจาะไม่เกิน 4 สัปดาห์และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้จากการศึกษาของวัชรี ประสิงห์ และสาคร พรประเสริฐ[9] พบว่าการใช้

ค่า HbA_2 > 6% ร่วมกับค่าเฉลี่ยของปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดง (Mean Corpuscular Volume : MCV) < 55 fl สามารถนำมาแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E ได้

งานเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมา ได้ให้บริการตรวจ Hb Typing ด้วยเทคนิค CE ซึ่งพบปัญหาการแปลผล Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E ที่มีสัดส่วนของ HbA_2/E > 75% และ HbF >5% ทำให้มีจำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจยืนยันความผิดปกติในระดับดีเอ็นเอจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดภาระงานและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมีความสนใจในการศึกษาความถูกต้องของการใช้ EE score ร่วมกับการใช้ค่า MCV ในการวินิจฉัยภาวะ Homozygous Hb E และ β^0-thalassemia/Hb E เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการนำ EE score ร่วมกับการใช้ค่า MCV มาช่วยในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์

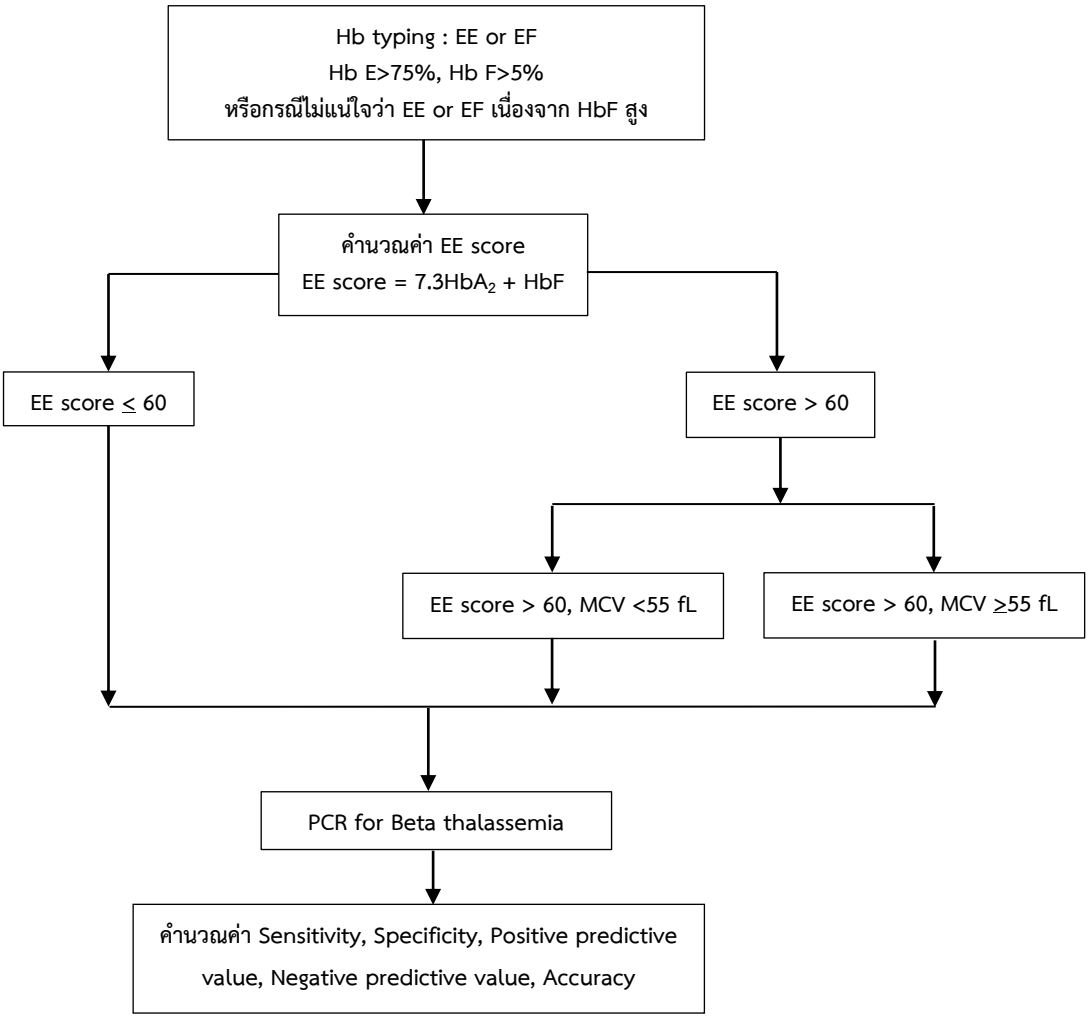
กิจกรรมการพัฒนา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบวิเคราะห์ไปข้างหน้า (Prospective analytic study) โดยกลุ่มตัวอย่างเป็นตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA จากโรงพยาบาลในเขตสุขภาพที่ 9 ที่ส่งตรวจยืนยัน Hb Typing ที่งานเวชศาสตร์ชันสูตร ศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมา ระหว่างเดือนตุลาคม 2561– กันยายน 2562 โดยโรงพยาบาลที่ส่งตรวจได้ทดสอบความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดด้วยเครื่องอัตโนมัติและแนบผลการตรวจมาพร้อมตัวอย่างเลือด จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ Hb Typing ด้วยเครื่อง Sebia capillary II นำตัวอย่างเลือดทุกรายที่ผล Hb typing เป็น EE or EF; HbE>75% และ HbF>5% หรือกรณีไม่แน่ใจเนื่องจาก HbF สูง ไปคำนวณหาค่า EE Score ตามสูตร EE score = $7.3HbA_2$+Hb F โดยแปลผลดังนี้

EE score $\leq$ 60 แปลผลว่าเป็น Homozygous HbE

EE score > 60 แปลผลว่าเป็น β^0-thalassemia/Hb E

จากนั้นแบ่งข้อมูลตัวอย่าง เป็น 3 ชุด คือชุดที่ 1 ค่า EE score $\leq$ 60 ชุดที่ 2 ค่า EE score > 60 และ MCV $\geq$55 fL ชุดที่ 3 ค่า EE score > 60 และค่า MCV<55 fL แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจยืนยันหาความผิดปกติของยีนเบต้า-มิวเตชั่น โดยวิธี Real-Time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และนำข้อมูลไปคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าการทำนายผลบวก (Positive predictive value) ค่าการทำนายผลลบ (Negative predictive value) และค่าความถูกต้อง (Accuracy) โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ซึ่งแนวทางการศึกษาแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงแนวทางการศึกษาการประยุกต์ใช้ EE score และ Mean Corpuscular Volume ในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E

การวัดผลและผลการเปลี่ยนแปลง

จากการศึกษาพบตัวอย่างเลือดที่มีผล Hb typing เป็น EE or EF โดย HbE>75% และ HbF>5% หรือกรณีไม่แน่ใจเนื่องจาก HbF สูง ระหว่างเดือน ตุลาคม 2561 – กันยายน 2562 จำนวนทั้งหมด 184 ราย โดยมีตัวอย่างเลือดที่มี EE score≤ 60 เท่ากับ 177 ราย EE score>60 เท่ากับ 7 ราย แสดงรายละเอียดค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด และผล Hb Typing ในกลุ่ม EE score>60 ดังตารางที่ 1 เมื่อนำข้อมูลไปคำนวณความถูกต้องของการใช้ค่า EE score ในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ได้ค่าความถูกต้องเท่ากับ 97.8% แสดงตามตารางที่ 2 และเมื่อคำนวณค่าความถูกต้องของการใช้ค่า EE score ร่วมกับค่า MCV< 55 fL ในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ได้ค่าความถูกต้องเท่ากับ 100 % แสดงตามตารางที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด และผล Hb Typing ในกลุ่ม EE score>60

ที่	RBC ($x10^6$/ul)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)	Hb Typing	$\%A_2$	%E	%F	EE score $7.3xHbA_2+HbF$	Beta-thalassemia genes
1	6.52	12.0	39.8	61.0	18.4	21.0	EE or EF	6.0	77.7	16.3	60.10	Positive for Homozygous HbE gene
2	5.98	12.6	38.7	65	21.1	23.4	EE or EF	6.6	79.8	12.6	60.8	Positive for Homozygous HbE gene
3	4.93	7.9	24.7	50.2	16.1	21.0	EE or EF	7.9	77.2	5.1	62.8	Positive for Codon 41/42 gene, Positive for HbE gene
4	6.20	12.6	39.4	63.6	20.4	20.6	EE or EF	6.1	74.7	19.2	63.7	Positive for Homozygous HbE gene
5	6.35	10.6	32.1	50.5	16.7	19.7	EE or EF	8.5	79.0	12.5	74.6	Positive for Codon 17 gene, Positive for HbE gene
6	5.72	11.0	32.0	55.9	19.2	19	EE or EF	6.7	78.2	11.7	60.6	Positive for Homozygous HbE gene
7	4.91	6.3	22.7	46.3	12.8	27.3	EE or EF	10	77.1	12.9	85.9	Positive for Codon 41/42 gene, Positive for HbE gene

ตารางที่ 2 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องของการใช้ค่า EE score ในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

การวินิจฉัย	PCR for β-thalassemia		รวม
	เป็นโรค	ไม่เป็นโรค	
ค่า EE score>60	3 (TP)	4 (FP)	7
ค่า EE score$\leq$60	0 (FN)	177 (TN)	177
รวม	3	181	184

ความไว	= TP/TP+FN = 3/3	= 100%
ความจำเพาะ	= TN/FP+TN= 177/181	= 97.8%
ค่าการทำนายผลบวก	= TP/TP+FP= 3/7	= 42.8%
ค่าการทำนายผลลบ	= TN/TN+FN= 177/177	= 100%
ความถูกต้อง	= TP+TN/TP+FP+FN+TN= 180/184	= 97.8%

ตารางที่ 3 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องของการใช้ค่า EE score ร่วมกับค่า MCV< 55 fL ในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

การวินิจฉัย	PCR for β-thalassemia		รวม
	เป็นโรค	ไม่เป็นโรค	
ค่า EE score>60 และค่า MCV< 55 fL	3 (TP)	0 (FP)	3
ค่า EE score>60 และค่า MCV≥ 55 fL	0 (FN)	4 (TN)	4
รวม	3	4	7

ความไว	= TP/TP+FN = 3/3	= 100%
ความจำเพาะ	= TN/FP+TN= 4/4	= 100%
ค่าการทำนายผลบวก	= TP/TP+FP= 3/3	= 100%
ค่าการทำนายผลลบ	= TN/TN+FN= 4/4	= 100%
ความถูกต้อง	= TP+TN/TP+FP+FN+TN= 7/7	= 100%

บทเรียนที่ได้รับ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการใช้ค่า EE score ร่วมกับค่า MCV< 55 fL ในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานได้ค่าความถูกต้อง 100% ซึ่งสูงกว่าการใช้ค่า EE scoreเพียงอย่างเดียวที่ได้เท่ากับ 97.8% อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดเรื่องจำนวนตัวอย่างเลือดที่มีผล Hb typing เป็น EE or EF โดย HbE>75% และ HbF>5% และมีค่าEE score>60 มีจำนวนน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้ค่า EE score อย่างเดียวในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E ได้ค่าความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวกเท่ากับ 97.8% และ 42.8% ตามลำดับ โดยค่าการทำนายผลบวกต่ำกว่าการศึกษาของกฤษดาและคณะ[8] ที่พบความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวก เท่ากับ 96.5% และ 85.7% ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากตัวอย่างเลือดที่ตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมาถูกส่งมาจากโรงพยาบาลชุมชนในเขตสุขภาพที่ 9 ทาง EMS อาจทำให้อุณหภูมิไม่ได้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียสตามการศึกษาของกฤษดาและคณะ

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถประยุกต์ใช้ค่า EE score ร่วมกับค่า MCV< 55 fL ในการวินิจฉัยแยก Homozygous HbE และ β^0-thalassemia/Hb E ออกจากกันได้ เมื่อคำนวณค่าใช้จ่ายในการตรวจยืนยันหาความผิดปกติของยีนเบต้า-มิวเตชั่น โดยวิธี Real-Time PCR ซึ่งราคาเท่ากับ 1200 บาท/ราย จะสามารถลดค่าใช้จ่ายทั้งหมดเท่ากับ 1,200 บาท x 181 ราย เท่ากับ 217,200 บาท นอกจากนี้ยังทำให้ลดภาระงานของเจ้าหน้าที่ในการตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของยีนเบต้า-มิวเตชั่นด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Sirichotiyakul S, Tantipalakorn C, Sanguansermsri T, Wanapirak C, Tongsong T. Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. Int J Gynaecol Obstet 2004; 86: 347-50.

2. 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.

3. 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.

4. Nathalang O, Nillakupt K, Arnutti P, Boonsiri T, Panichkul S, Areekul W. Screening for thalassemia and hemoglobinopathy in a rural area of Thailand: a preliminary study. J Med Assoc Thai 2005; 88(S3): 35-42.

5. 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.

6. Pornprasert S, Kasemrad C, Sukunthamala K. Diagnosis of thalassemia on dried blood spot samples by high performance liquid chromatography. Hemoglobin 2010; 34: 486-94.

7. 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.

8. Singha K, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. EE score: an index for simple differentiation of homozygous hemoglobin E and hemoglobin E-0-thalassemia. Clin Chem Lab Med 2018; 56(9): 1507-13.

9. 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(3): 226-30.