ความคงตัวของตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดสำหรับการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย

Stability of Dried Blood Spot Specimen for Thalassemia Diagnosis

วันวิสาข์ เนตรเรืองแสง* และ ปณิตา กลิ่นวิมล

Wanvisa Neadruengsang* and Panita Klinvimol

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

Regional Medical Sciences Center 6, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

Received : 11 June 2017

Accepted : 21 July 2017

Published online : 22 August 2017

บทคัดย่อ

การศึกษาความคงตัวของตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือด (DBS) สำหรับตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน และการตรวจยีนแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ประกอบด้วย คนปกติ พาหะฮีโมโกลบินอีและโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี จำนวน 9, 6 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับ รวมทั้งการตรวจยีนแอลฟ่าธาลัสซี-เมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) ในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างให้ผลลบ 16 ตัวอย่าง และผลบวกยีนแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA deletion) 4 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่สภาวะต่างกัน ได้แก่ อุณหภูมิห้อง, 37 องศาเซลเซียสและ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน และตรวจยีนแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ในวันที่ 1, 7, 14, 30, 60 และ 90 ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินพบว่าปริมาณฮีโมโกลบินมีความคงตัวมากที่สุดที่ 4 องศาเซลเซียสเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิห้องและที่ 37 องศาเซลเซียสเมื่อตรวจในวันเดียวกัน และความคงตัวของฮีโมโกลบินของทุกตัวอย่างจะลดลงเมื่อระยะเวลาที่ใช้เก็บนานขึ้น ในขณะที่การตรวจยีนแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดมีความสอดคล้องร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับการตรวจยีนในตัวอย่างเลือดครบส่วนในทุกสภาวะและทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา ดังนั้นการศึกษานี้น่าจะเป็นประโยชน์กับการเก็บตัวอย่างแบบกระดาษซับเลือดในการทดสอบซ้ำสำหรับตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย

คำสำคัญ : ตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือด การตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน การตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1

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

Abstract

The dried blood spot (DBS) stability was studied for Hb typing and alpha-thalassemia 1 diagnosis. The specimens were investigated by Hb typing from normal Hb typing, Hb E trait and Homozygous Hb E; 9, 6 and 5 samples, respectively. Including, the alpha-thalassemia 1 (SEA and THAI deletion) was investigated for 20 samples compose of 16 negative and 4 positive for alpha-thalassemia 1 (SEA deletion). The DBS was kept at room temperature (RT), 37°C and 4°C after that the Hb typing and alpha-thalassemia 1 was investigated at 1, 7, 14, 30, 60 and 90 days. Hb typing results, the stability of Hb had the greatest at 4°C when compare to RT and 37°C for the same day. The Hb stability was decreased when prolong the storage time. Meanwhile alpha-thalassemia 1 results of DBS correlated with whole blood (100%) in all temperature and storage time of study. In this study, the sample collection as DBS has an advantage for thalassemia retesting.

Keywords : Dried Blood Spot (DBS), Hb typing, alpha-thalassemia 1

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางที่เกิดจากความผิดปกติของยีนเบต้าโกลบินบนโครโมโซมที่ 11 หรือยีนแอลฟ่าโกลบินบนโครโมโซมที่ 16 ทำให้สังเคราะห์โกลบินไม่ได้ หรือสังเคราะห์ได้ในปริมาณน้อย ความผิดปกติจากการสังเคราะห์โกลบินก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เบต้าธาลัสซีเมียและแอลฟ่าธาลัสซีเมีย (Fucharoen, 2009) วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย ได้แก่ การตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing) และการตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ

การตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติในปัจจุบันมี 2 หลักการ คือ หลักการแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี ซึ่งมีทั้งชนิดแรงดันต่ำ (Low Pressure Liquid Chromatography: LPLC) และแรงดันสูง (High Pressure Liquid Chromatography: HPLC) และหลักการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Capillary Electrophoresis: CE) โดยตรวจจากตัวอย่างชนิดเลือดครบส่วน (Whole blood) ตัวอย่างเลือดครบส่วนที่เก็บไว้นานโมเลกุลของฮีโมโกลบินบางส่วนจะสลายไป (Degradation) ทำให้ค่า Retention time ที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติเปลี่ยนแปลง ซึ่งส่งผลกระทบต่อการแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน เมื่อห้องปฏิบัติการต้องการทดสอบซ้ำจึงต้องเก็บตัวอย่างเลือดครบส่วนจากคนไข้ใหม่ ส่วนการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี gap-PCR หรือการตรวจด้วยวิธี Relative Quantitative PCR (The work manual committee, 2015; 2016)

การเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษซับเลือดเป็นอีกทางเลือกในการเก็บสิ่งส่งตรวจสำหรับการตรวจวิเคราะห์โรคเป็นวิธีการที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกต่อการเก็บรักษาและการขนส่ง โดยเฉพาะการตรวจคัดกรองภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนในเด็กทารกแรกเกิด (Neonatal Screening Operation Centre, 2016; Knudsen *et al*., 1993) รวมทั้งการตรวจวินิจฉัย HIV ด้วยวิธี Real-time PCR (Luo, 2005) ที่มีการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือด

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความคงตัวของตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดครบส่วนสำหรับการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้หลักการ LPLC และการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับการเก็บรักษาตัวอย่างที่ต้องการทดสอบซ้ำสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างกระดาษซับเลือด

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ที่เหลือจากการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเป็นปกติ (A_2A, Hb $A_2 \leq 3.5\%$), พาหะฮีโมโกลบินอี (EA, Hb E $\geq 25\%$) และโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี (EE, Hb E $\geq 80\%$) จำนวน 9, 6 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับ ทั้งนี้ การใช้ตัวอย่างดังกล่าวได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระบวนการเตรียมตัวอย่างชนิดกระดาษซับจะนำตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษซับเลือด (Whatman filter paper เบอร์ 903) แล้วผึ่งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 3 ชั่วโมง แล้วนำใส่ถุงพลาสติกมีซิปปิดสนิทในแต่ละตัวอย่าง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง ตัวอย่างกระดาษซับเลือดจะถูกเก็บที่อุณหภูมิห้อง (RT), 37°C และ 4°C เป็นระยะเวลา 1, 7, 14, 30, 60 และ 90 วันก่อนนำไปตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน รวมทั้งตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

นำตัวอย่างเลือดครบส่วนปริมาตร 10-12 µl เจือจางในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml ในขณะที่ตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดจะถูกตัดเป็นวงแล้วแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 600 µl อย่างน้อย 30 นาที แล้วนำตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดไปตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้หลักการ LPLC (The Hb Gold analyser, Drew Scientific Ltd.) โดยใช้สารมาตรฐาน Hb A_2 (Lyphocheck® hemoglobin A_2 control: bi-level, BIO-RAD) เป็นสารควบคุมคุณภาพภายใน

3. การตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดครบส่วน และตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดด้วยชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd.) เพื่อตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) ด้วยชุดน้ำยาทดสอบความผิดปกติของยีนแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (DMSc alpha-thal 1, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Relative Quantitative PCR (เครื่องวิเคราะห์ Real-time PCR, Applied biosystems, 7500)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

สำหรับตัวอย่างที่ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ LPLC เป็นปกติ (A_2A) ค่าร้อยละของ Hb A_2 ที่วัดได้จากตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดในทุกสภาวะและในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษาจะถูกเทียบอัตราส่วนด้วยค่าร้อยละของ Hb A_2 จากตัวอย่างเลือดครบส่วน เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนแปลงของระดับฮีโมโกลบินในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดและตัวอย่างเลือดครบส่วน

สำหรับตัวอย่างกลุ่มพาหะของฮีโมโกลบินอี (EA) และโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี (EE) ทำการศึกษาความคงตัวของฮีโมโกลบิน โดยนำค่าร้อยละของ Hb E จากตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดมาเทียบอัตราส่วนด้วยค่าร้อยละของ

Hb E จากตัวอย่างเลือดครบส่วนของตัวอย่างกลุ่มพาหะฮีโมโกลบินอี (EA) และโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี (EE) ตามลำดับ แล้ววิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ one-way *ANOVA* ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

วิเคราะห์ผลการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) จากตัวอย่างเลือดครบส่วนเปรียบเทียบกับตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดในแต่ละสภาวะที่ทำการศึกษา และระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง เพื่อดูความสอดคล้องของผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดและตัวอย่างเลือดครบส่วน ค่าร้อยละของความสอดคล้อง คำนวณโดยนำจำนวนผลการวิเคราะห์ที่ให้ผลตรงกัน หารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดแล้วคูณด้วย 100

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การเปรียบเทียบความคงตัวของฮีโมโกลบินในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือด

การศึกษาความคงตัวของฮีโมโกลบินในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเป็นปกติ โดยการหาอัตราการเปลี่ยนแปลงของระดับ Hb A_2 ในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง, 37^{o}C และ 4^{o}C ในช่วงระยะเวลา 1, 7 14, 30, 60 และ 90 วัน (ตารางที่ 1) จากผลการศึกษาของตัวอย่างที่ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเป็นปกติ จำนวน 9 ตัวอย่างพบว่าค่า Hb A_2 ของตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน (Day 1) มีอัตราการเปลี่ยนแปลงของ Hb A_2 จากร้อยละ 149 เป็นร้อยละ 378 เมื่อเก็บเป็นเวลา 90 วัน (Day 90) และตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิ 37^{o}C มีอัตราการเปลี่ยนแปลงของ Hb A_2 จากร้อยละ 180 เป็นร้อยละ 406 จะเห็นว่าตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บในสภาวะอุณหภูมิห้องและ 37^{o}C มีค่า Hb A_2 สูงขึ้นเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้น ในขณะที่ตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4^{o}C มีความคงตัวของ Hb A_2 มากกว่า ดังจะเห็นได้จากเส้นแนวโน้มของอัตราการเปลี่ยนแปลงของ Hb A_2 (ร้อยละของ Hb A_2 = 150–180) ดังแสดงในภาพที่ 1 A

ความคงตัวของฮีโมโกลบินในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดกลุ่มพาหะของฮีโมโกลบินอีและโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี พบว่าปริมาณร้อยละของ Hb E มีแนวโน้มลดลงเมื่อเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลานานขึ้นทั้งในสภาวะอุณหภูมิห้อง, 37 ^{o}C และ 4 ^{o}C แต่ความคงตัวของ Hb E ในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่อุณหภูมิ 4^{o}C มีความคงตัวมากกว่าที่ 37^{o}C และอุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 1B, C)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดครบส่วน และตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง, 37°C และ 4°C เป็นระยะเวลา 1, 7, 14, 30, 60 และ 90 วัน

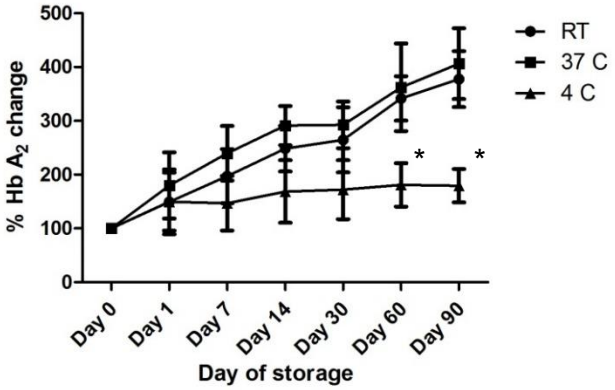
	Percentage of hemoglobin changed						
	RT		37°C		4°C		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	p-value*
Normal Hb typing (A_2A), n= 9							
Day 0	100	0	100	0	100	0	
Day 1	149.43	60.25	179.94	61.41	149.92	45.06	>0.05
Day 7	197.36	50.50	239.78	50.83	146.77	50.85	>0.05
Day 14	248.56	42.52	291.25	36.64	168.64	58.09	>0.05
Day 30	264.91	60.50	292.76	43.29	172.15	54.92	>0.05
Day 60	341.86	41.15	362.43	81.58	180.99	40.30	<0.05*
Day 90	377.78	52.07	406.48	65.71	179.54	31.16	<0.05*
Hb E trait (EA), n= 6							
Day 0	100	0	100	0	100	0	
Day 1	92.19	3.79	88.48	6.62	95.59	2.78	>0.05
Day 7	75.47	8.25	71.80	12.43	86.39	3.18	>0.05
Day 14	71.24	10.21	70.21	8.86	85.13	4.39	>0.05
Day 30	64.97	15.91	58.48	10.76	78.92	4.13	>0.05
Day 60	52.01	7.71	52.97	7.93	79.64	4.09	<0.05*
Day 90	51.25	2.10	51.61	1.15	82.45	5.64	<0.05*
Homozygous Hb E (EE), n= 5							
Day 0	100		100		100		
Day 1	97.34	2.46	75.38	2.59	93.68	4.59	>0.05
Day 7	65.98	3.71	60.77	2.44	89.05	4.13	>0.05
Day 14	57.81	4.70	55.33	4.33	81.24	6.10	<0.05
Day 30	48.49	4.38	40.87	4.70	73.85	3.40	<0.05*
Day 60	nd	nd	37.19	2.50	73.01	2.91	<0.05*
Day 90	33.23	2.99	33.24	4.10	72.51	1.06	<0.05*

* แสดงถึง p value < 0.05 ด้วยวิธี one-way *ANOVA*

nd : no data

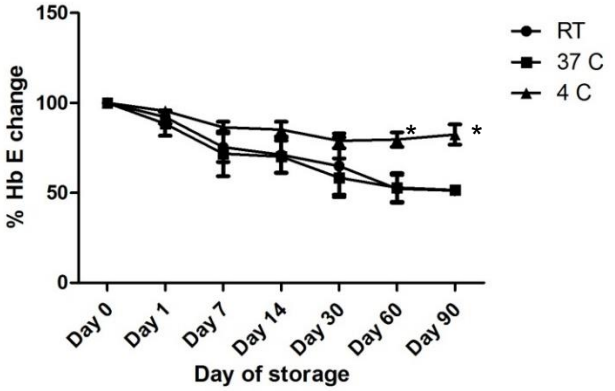
(A)

Normal Hb typing



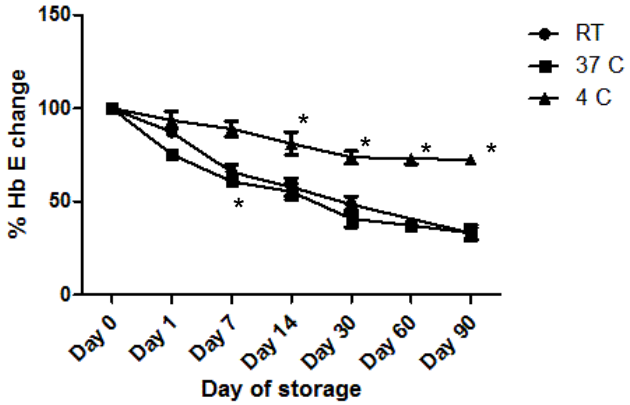
(B)

Hb E trait



(C)

Homozygous Hb E



ภาพที่ 1 อัตราการเปลี่ยนแปลงของระดับฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดครบส่วน และตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง, 37°C และ 4°C เป็นระยะเวลา 1, 7, 14, 30, 60 และ 90 วัน

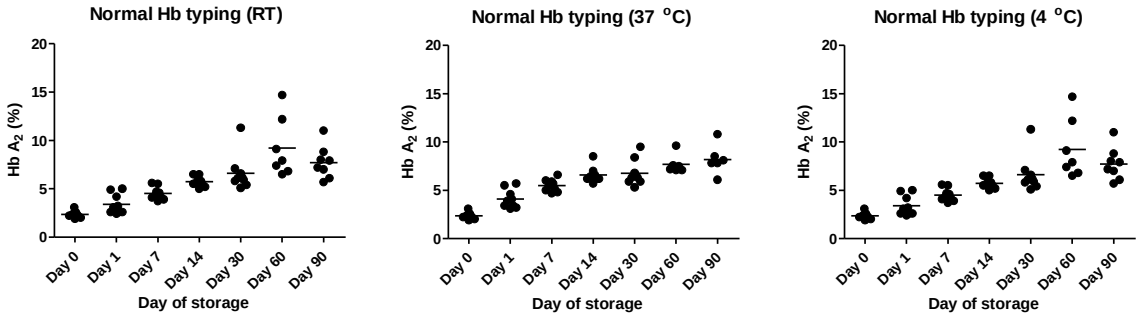
(A) อัตราการเปลี่ยนแปลงของ Hb A_2 ในตัวอย่างที่ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเป็นปกติ จำนวน 9 ตัวอย่าง

(B) อัตราการเปลี่ยนแปลงของ Hb E ในพาหะของฮีโมโกลบินอี จำนวน 6 ตัวอย่าง

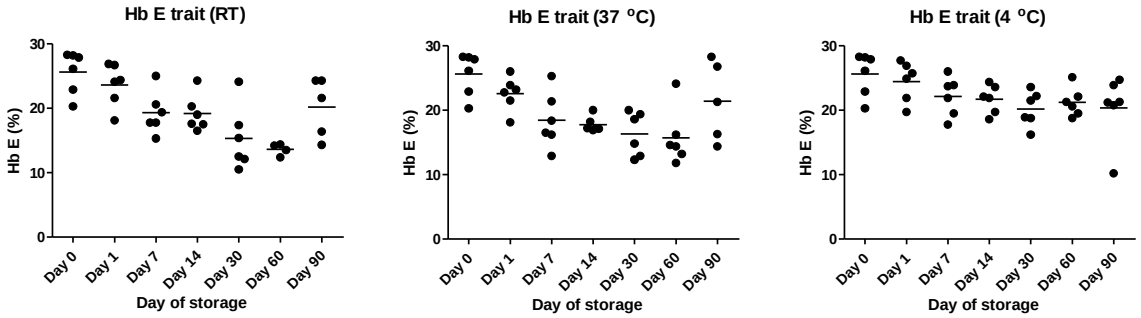
(C) อัตราการเปลี่ยนแปลงของ Hb E ในโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี จำนวน 5 ตัวอย่าง

*แสดงถึง p value < 0.05 ด้วยวิธี one-way *ANOVA*

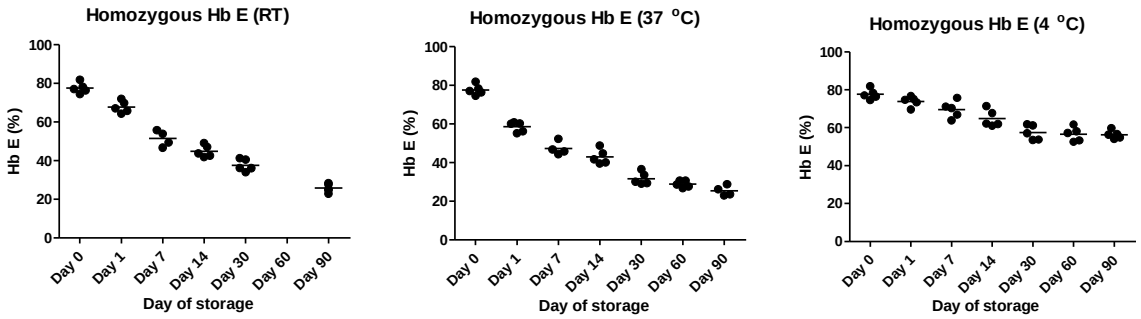
(A) Normal Hb typing



(B) Hb E trait



(C) Homozygous Hb E



ภาพที่ 2 ร้อยละของฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดครบส่วน และตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง, 37°C และ 4°C เป็นระยะเวลา 1, 7, 14, 30, 60 และ 90 วัน

(A) ร้อยละของ Hb A_2 ในตัวอย่างที่ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเป็นปกติ

(B) ร้อยละของ Hb E ในพาหะของฮีโมโกลบินอี

(C) ร้อยละของ Hb E ในโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี

อย่างไรก็ดี การแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติตามเกณฑ์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขจะพิจารณาจากค่าร้อยละของปริมาณฮีโมโกลบิน กล่าวคือ ตัวอย่างที่ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเป็นปกติจะมีค่า Hb $A_2 \leq 3.5\%$, ตัวอย่างพาหะฮีโมโกลบินอีมีค่า Hb E $\geq 25\%$ และโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอีมีค่า Hb E $\geq 80\%$ จากอัตราการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮีโมโกลบินในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดจะเห็นว่าค่าร้อยละของ Hb A_2 และ Hb E ส่งผลกระทบต่อการแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ดังจะเห็นได้จากตัวอย่างกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน มีค่า Hb A_2 ในตัวอย่างเลือดครบส่วนเท่ากับ 2.3% แต่เมื่อเก็บตัวอย่างแบบกระดาษซับเลือดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน จะมีค่า Hb A_2 เท่ากับ 7.7% (ภาพที่ 2A) ทำให้การแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินเปลี่ยนจากปกติเป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย (พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่า Hb A_2 = 3.6-8%) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างพาหะของฮีโมโกลบินอีตัวอย่างเลือดครบส่วนมีค่า Hb E = 25.6% และมีแนวโน้มลดลงในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน (Hb E = 20.2%) การแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินจากพาหะของฮีโมโกลบินอีที่ไม่มีความผิดปกติของยีนแอลฟ่า (Hb E trait) เปลี่ยนเป็นภาวะที่อาจมีความผิดปกติของยีนแอลฟ่าร่วมด้วย (Hb E trait with or without alpha-thalassemia) ส่วนตัวอย่างกลุ่มโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี ค่า Hb E ในตัวอย่างเลือดครบส่วนเท่ากับ 77.6% ลดลงเหลือ 25.8% ในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน โดยการแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินมีการเปลี่ยนแปลงจากโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอีเป็นพาหะของฮีโมโกลบินอี ดังนั้นทางเลือกในการเก็บตัวอย่างแบบกระดาษซับเลือด แม้จะเป็นประโยชน์สำหรับการเก็บรักษาตัวอย่างที่ต้องการทดสอบซ้ำ รวมทั้งประหยัดพื้นที่ และค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาตัวอย่าง อย่างไรตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อหาเกณฑ์ที่เหมาะสมในการแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินจากตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือด ดังการศึกษาของ Pornprasert *et al*., 2010 กำหนดเกณฑ์สำหรับการแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดด้วยเครื่อง HPLC หรือทำการศึกษาความคงตัวของฮีโมโกลบินในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 $^{\circ}$C หรือ - 70°C เพื่อดูว่าฮีโมโกลบินมีความคงตัวเพิ่มขึ้นหรือไม่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิดังกล่าว

2. ความสอดคล้องของการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) ในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือด

ผลการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 จากดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดครบส่วนจำนวน 20 ตัวอย่าง ให้ผลเป็นลบต่อการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA and THAI deletion) จำนวน 16 ตัวอย่าง และให้ผลเป็นบวกต่อการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA deletion) จำนวน 4 ตัวอย่าง ในขณะที่ผลการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ในตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง, 37°C และ 4°C (เก็บรักษากระดาษซับเลือดในแต่ละสภาวะเป็นเวลา 1, 7, 14, 30, 60 และ 90 วัน) ให้ผลเป็นลบจำนวน 16 ตัวอย่าง และให้ผลเป็นบวก (ชนิด SEA deletion) จำนวน 4 ตัวอย่างในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา จากผลการศึกษาจะเห็นว่าการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) ในตัวอย่างเลือดครบส่วนและกระดาษซับเลือดมีความสอดคล้องกันร้อยละ 100 ในทุกสภาวะและในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 2) ดังนั้นการเก็บตัวอย่างแบบกระดาษซับเลือดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเหมาะกับพื้นที่ที่เข้าถึงยาก เนื่องจากอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่างไม่ส่งผลกระทบกับการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1

ตารางที่ 2 ความสอดคล้องของการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) ด้วยวิธี Relative Quantitative PCR ระหว่างตัวอย่างเลือดครบส่วนและตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือด

		Dried Blood Spot (DBS)											
		Room temperature				37°C				4°C			
		Negative *	SEA trait **	Total	% concordance	Negative *	SEA trait **	Total	% concordance	Negative *	SEA trait **	Total	% concordance
Whole Blood	Negative *	16	0	16	100	16	0	16	100	16	0	16	100
	SEA trait **	0	4	4	100	0	4	4	100	0	4	4	100
	Total	16	4	20		16	4	20		16	4	20	

* Negative: Negative for alpha-thalassemia 1 (SEA and THAI deletion)

** SEA trait: Positive for alpha-thalassemia 1 (SEA deletion)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความคงตัวของตัวอย่างชนิดกระดาษซับเลือดพบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บตัวอย่างไม่ส่งผลกระทบต่อการตรวจแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 (ชนิด SEA and THAI deletion) แต่ส่งผลกระทบกับการแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติหลักการ LPLC จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาเกณฑ์ที่เหมาะสมในการแปลผลการตรวจ หรือหาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างแบบกระดาษซับเลือด สำหรับการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน เพื่อให้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาตัวอย่างที่ต้องการทดสอบซ้ำ รวมทั้งประหยัดพื้นที่และค่าใช้จ่ายในการจัดเก็บอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Fucharoen, G. (2009). *Laboratory testing for Thalassemia diagnosis and Hemoglobinopathies in Thailand*. Khon Kean: Khon Kean University Publisher. (in Thai)

Knudsen, R.C., Slazyk, W.E., Richmond, J.Y., Hannon, W.H. (1993). Guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention for the shipment of dried blood spot specimens. *Infant Screening, 16* (1), 1-3.

Luo, W., Yang, H., Rathbun, K., Pau, C., Ou, C. (2005). Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology, 43* (4), 1851-1857

Neonatal Screening Operation Centre. (2016). Retrieved February 21, 2016, from http://www.neoscreen.go.th

Pornprasert, S., Kasemrad, C., Sukunthamala, K. (2010). Diagnosis of thalassemia on dried blood spot samples by high performance liquid chromatography. *Hemoglobin, 34 (5)*, 486-494.

The work manual committee of Thalassemia diagnosis and Hemoglobinopathies for laboratory. (2015) Revised Edition. *Working manual, Thalassemia diagnosis and Hemoglobinopathies for laboratory.* Bangkok: Knockout blow Publisher. (in Thai)

The work manual committee of Thalassemia diagnosis and Hemoglobinopathies for laboratory. (2016) *Guideline for Thalassemia control and prevention for laboratory testing*. Bangkok: Knockout blow Publisher. (in Thai)