นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาผลลัพธ์จากการเปลี่ยนเกณฑ์การวินิจฉัยพาหะของ beta-thalassemia โดยใช้ระดับ hemoglobin A_2 มากกว่าร้อยละ 3.5 ในระบบการควบคุมโรค beta-thalassemia ในเขตภาคเหนือตอนล่าง

สวิชญาพร เจิมนิ่ม ปวันรัตน์ สวนนุ่ม ปริศนา เจริญพร มณฑิรา จันทร์อิน สุภารัตน์ จอนคำ สุดาลักษณ์ ฉิมเสือ เอกอมร เทพพรหม รวิสุต เดียวอิศเรศ และ พีระพล วอง

หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

บทนำ *การตรวจคัดกรองพาหะของ beta-thalassemia เพื่อใช้กำหนดคู่เสี่ยง beta-thalassemia ในประเทศไทยใช้การตรวจวิเคราะห์ hemoglobin (Hb) typing เป็นหลัก โดยพิจารณาจากสัดส่วนของ Hb A_2 ปัจจุบันกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ปรับเกณฑ์สัดส่วนของ Hb A_2 เพื่อวินิจฉัยพาหะของ beta-thalassemia จากมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 4.0 เป็นมากกว่าร้อยละ 3.5 เท่ากันทั่วประเทศ* ***วัตถุประสงค์*** *เพื่อตรวจหา beta-globin mutation ในตัวอย่างเลือดที่มีสัดส่วนของ Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 และศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนเกณฑ์ดังกล่าวต่อระบบการตรวจวินิจฉัยเพื่อควบคุมโรค* ***วิธีการ*** *รวบรวมตัวอย่างเลือดของคู่สามีภรรยาที่ส่งตรวจเพื่อกำหนดคู่เสี่ยงธาลัสซีเมีย ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ช่วงเดือนตุลาคม 2557 ถึง ธันวาคม 2561 โดยคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีสัดส่วนของ Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 นำมาตรวจหา beta-globin mutation ด้วยวิธี real time-PCR ร่วมกับ high resolution melting analysis และ DNA sequencing นำผลการตรวจที่ได้มาพิจารณาร่วมกับผลการตรวจของคู่สมรสเพื่อยืนยันคู่เสี่ยง เปรียบเทียบภาระงานและจำนวนคู่เสี่ยงที่เพิ่มขึ้น* ***ผลการศึกษา*** *จากคู่สามีภรรยาที่ส่งตรวจเพื่อกำหนดคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia ทั้งสิ้น 7,110 คู่ พบผู้ที่เป็นพาหะของ beta-thalassemia ที่มีสัดส่วนของ Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 จำนวน 41 ราย ตรวจพบ beta-globin mutation 7 ราย (ร้อยละ 17.1) เป็น $beta^0$-thalassemia mutation 2 ราย [IVS-1 nucleotide (nt) 1 (G>T), codon 41/42 (-TTCT)] และ $beta^+$-thalassemia mutation 5 ราย [nt -31 (A>G), nt -28 (A>G), codon 126 (GTG>GGG)] การปรับเกณฑ์การวินิจฉัยดังกล่าวทำให้มีคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia เพิ่มขึ้น 26 คู่ จากเดิม 262 คู่ คิดเป็นภาระงานที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 9.9 ยืนยันการวินิจฉัยคู่เสี่ยงจากการพบ beta-globin mutation จำนวน 4 คู่ คิดเป็นคู่เสี่ยงจริงที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 1.5* ***สรุป*** *ภาระงานที่เกิดจากผลบวกลวงที่เพิ่มขึ้นจากการปรับเกณฑ์วินิจฉัยดังกล่าวดูไม่มากนักเมื่อเทียบกับจำนวนคู่เสี่ยง beta-thalassemia ที่ตรวจพบทั้งหมด โดยพบคู่เสี่ยงจริงเพิ่มขึ้นจึงนับเป็นการลงทุนที่คุ้มค่า อย่างไรก็ดีผลบวกลวงดังกล่าวอาจนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยไม่จำเป็นเพิ่มขึ้นเช่นกัน*

คำสำคัญ : *● เบต้าธาลัสซีเมีย ● ฮีโมโกลบินเอทู ● คู่เสี่ยง*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2563;30:165-70.

ได้รับต้นฉบับ 26 ธันวาคม 2562 แก้ไขบทความ 2 มกราคม 2563 รับลงตีพิมพ์ 24 กุมภาพันธ์ 2563

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ.นพ.พีระพล วอง หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 99 หมู่ 9 ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จ.พิษณุโลก E-mail: peeraponw@nu.ac.th

Original aticle

Outcomes from adjusting the diagnostic criterion for beta-thalassemia carrier status using hemoglobin A_2 level more than 3.5% from a beta-thalassemia prenatal control program in lower northern Thailand

Sawichayaporn Jermnim, Pawanrat Suannum, Prissana Charoenporn, Monthira Chan-in, Suparat Johnkom, Sudalug Chimsua, Akamon Tapprom, Rawisut Deoisares and Peerapon Wong

Thalassemia Research Unit, Hematology Research Center, Faculty of Medicine, Naresuan University

Abstract:

Introduction: *In Thailand, mass screening of beta-thalassemia carrier state for prenatal control by determining the hemoglobin (Hb) A_2 fraction is a mainstay of the diagnostic method. Currently, the cut-off value of 4.0% or greater has been replaced with the fraction of more than 3.5% by the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.* ***Objective:*** *The study aimed to detect beta-thalassemia heterozygotes in samples with Hb A_2 levels ranging from 3.6 - 3.9% and to study the impact of the new cut-off value on numbers of carriers and at-risk couples identified.* ***Method:*** *Hb analysis records of couples who had been investigate for beta-thalassemia risk were collected at the Thalassemia Research Unit, Naresuan University Hospital between October 2014 and December 2018. Real time-PCR with high resolution melting analysis and DNA sequencing were performed to detect beta-globin mutations in blood specimens with Hb A_2 values between 3.6 and 3.9%. All new beta-thalassemia carriers identified together with results of their spouses were re-evaluated for new at-risk couples. Numbers of new carriers and at-risk couples identified were determined with numbers derived using the former criterion.* ***Results:*** *Among 7,110 couples, 41 samples with Hb A_2 fraction between 3.6 and 3.9% were detected and diagnosed with new beta-thalassemia carriers. From the 41 samples, 7 beta-thalassemia alleles were identified (17.1%). In all, 2 $beta^0$-thalassemia [IVS-1 nucleotides (nt) 1 (G>T), codon 41/42 (-TTCT)] and 5 $beta^+$-thalassemia heterozygotes [nt -31 (A>G), nt -28 (A>G), codon 126 (GTG>GGG)] were identified. Adjusting the cut-off values added 26 (9.9%) more phenotypic and 4 (1.5%) more genetically proven at-risk couples.* ***Conclusion:*** *The increment of false-positive numbers of at-risk couples resulted from the new cut-off level of Hb A_2 seemed negligible compared with the total numbers of at-risk couples identified. However, some false-positive couples may obtain unnecessary obstetric procedures for prenatal diagnosis.*

Keywords : ● *Beta-thalassemia* ● *Hemoglobin A_2* ● *At-risk couple*

J Hematol Transfus Med. 2020;30:165-70.

บทนำ

Homozygous beta-thalassemia และ hemoglobin (Hb) E/beta-thalassemia เป็น โรค beta-thalassemia ที่เป็นปัญหาของประเทศไทย การวินิจฉัยพาหะ beta-thalassemia เพื่อใช้กำหนดคู่เสี่ยง beta-thalassemia ชนิดรุนแรงในประเทศไทยใช้การตรวจวิเคราะห์ Hb typing โดยพิจารณาจากสัดส่วนของ Hb A_2 เป็นหลัก ซึ่งที่ผ่านมาใช้สัดส่วน Hb A_2 มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 4.0 เป็นเกณฑ์ในการวินิจฉัย ปัจจุบันมีรายงานการพบพาหะ beta-thalassemia ที่มีสัดส่วนของ Hb A_2 อยู่ในระดับก้ำกึ่งเมื่อเทียบกับเกณฑ์วินิจฉัย หรือที่เรียกว่า borderline Hb A_2 และมีโอกาสเป็นคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia ชนิดรุนแรง[1,2] และมีการศึกษาพบปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้พาหะ beta-thalassemia มีสัดส่วนของ Hb A_2 ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น[3] ในปี 2559 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จึงได้ปรับเกณฑ์สัดส่วน Hb A_2 เพื่อวินิจฉัยพาหะ beta-thalassemia เป็นมากกว่าร้อยละ 3.5 เท่ากันทั่วประเทศ[4] เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำหนดคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia ชนิดรุนแรงให้มากขึ้น

ที่ผ่านมามีรายงานการพบพาหะ beta-thalassemia ที่มีสัดส่วนของ Hb A_2 อยู่ระหว่างร้อยละ 3.5 ถึง 4.0 ในหลายภูมิภาคในประเทศไทย[5,6] โดยภาคกลางพบพาหะ beta-thalassemia จำนวน 12 ราย จากตัวอย่างที่มี Hb A_2 อยู่ในพิสัยดังกล่าวทั้งหมด 112 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.7 ในจำนวนนี้เป็น beta$^+$-thalassemia 10 ราย [codon 19 (AAC>AGC) (Hb Malay) 5 ราย และ codon 126 (GTG>GGG) (Hb Dhonburi) 5 ราย] และ beta^0-thalassemia 2 ราย [codon 17 (AAG>TAG) 1 ราย และ codon 41/42 (-TTCT) 1 ราย][5] รายงานจากภาคเหนือพบ borderline Hb A_2 (พิสัยร้อยละ 3.6-3.9) เพียง 13 ตัวอย่าง จากตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจเพื่อกำหนดคู่เสี่ยงของธาลัสซีเมียทั้งหมด 2,193 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.6) จากทั้ง 13 ตัวอย่างดังกล่าว พบ beta$^+$-thalassemia 5 ตัวอย่าง (Hb Dhonburi 4 ตัวอย่าง และ CAP site mutation [CAP+1 (A>C)] 1 ตัวอย่าง) คิดเป็นร้อยละ 38.5 ไม่พบ beta^0-thalassemia mutation ในพิสัยดังกล่าว แต่พบ beta^0-thalassemia 1 ตัวอย่าง [codon 41/42 (-TTCT)] อยู่ในกลุ่มตัวอย่างที่มี Hb A_2 ร้อยละ 3.1-3.5 โดยตัวอย่างดังกล่าวมี delta-globin mutation [nucleotide (nt) -77 (T>C)] ร่วมอยู่ด้วย[6] จากการศึกษาที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าการปรับเกณฑ์การวินิจฉัยพาหะ beta-thalassemia โดยใช้สัดส่วน Hb A_2 มากกว่าร้อยละ 3.5 ทำให้สามารถวินิจฉัยพาหะ beta-thalassemia ได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ดีปัจจุบันยังไม่พบข้อมูลที่แสดงให้เห็นถึงผลลัพธ์จากการเปลี่ยนแปลงเกณฑ์การวินิจฉัยพาหะ beta-thalassemia ในแง่ของจำนวนคู่เสี่ยงที่พบเพิ่มขึ้น รวมถึงผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงเกณฑ์การวินิจฉัยดังกล่าวที่มีต่อภาระงานและความเสี่ยงที่เกิดจากการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยไม่จำเป็น การศึกษาชิ้นนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อค้นหา beta-globin mutation เพื่อวินิจฉัยพาหะของ beta-thalassemia ในตัวอย่างเลือดที่มีสัดส่วนของ Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 ในเขตภาคเหนือตอนล่าง และศึกษาผลลัพธ์และผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงเกณฑ์ดังกล่าวต่อระบบการตรวจวินิจฉัยเพื่อควบคุมโรค

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสัดส่วนของ beta-globin mutation ในตัวอย่างเลือดที่มีสัดส่วนของ Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 ในเขตภาคเหนือตอนล่าง และศึกษาผลลัพธ์และผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงเกณฑ์ดังกล่าวต่อระบบการตรวจวินิจฉัยเพื่อควบคุมโรค

วัสดุและวิธีการ

รวบรวมข้อมูลของคู่สามีภรรยาที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์ Hb typing ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อกำหนดคู่เสี่ยง beta-thalassemia ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตั้งแต่ตุลาคม 2557 ถึง ธันวาคม 2561 คัดเลือกตัวอย่างเลือดทุกรายที่มีสัดส่วน Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9

วิธีการ

1. นำตัวอย่างเลือดที่มีสัดส่วน Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 ทั้งหมดมาตรวจหา beta-globin mutation ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) ร่วมกับ high-resolution DNA melting analysis (HRM)
2. นำตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ beta-globin mutation มาทำการตรวจซ้ำ ด้วยวิธี DNA sequencing[7]
3. วิเคราะห์สัดส่วนของ beta-globin mutation ที่พบเป็นค่าร้อยละของตัวอย่างทั้งหมดที่มีสัดส่วน Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 และรายงานผลชนิดของ mutation ค่าสัดส่วนของ Hb A_2 และค่า mean corpuscular volume (MCV)
4. วิเคราะห์จำนวนพาหะ beta-thalassemia ที่พบเพิ่มขึ้น จำนวนคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia ชนิดรุนแรงที่เพิ่มขึ้นจากการใช้เกณฑ์ใหม่เทียบกับจำนวนพาหะและคู่เสี่ยงที่วินิจฉัยจากเกณฑ์เดิมเป็นค่าร้อยละ

ผลการศึกษา

จากคู่สามีภรรยาที่ส่งตรวจเพื่อกำหนดคู่เสี่ยงของ beta-thalasse-mia ทั้งสิ้น 7,110 คู่ พบผู้ที่เป็นพาหะของ beta-thalassemia ที่มีสัดส่วนของ Hb A_2 อยู่ในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 จำนวน 41 ราย จากการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ร่วมกับ HRM และ DNA sequencing ในตัวอย่างเป้าหมาย 41 ราย พบ beta^0-thalassemia mutation จำนวน 2 ราย ประกอบด้วย IVS-1 nt 1 (G>T) และ ชนิด codon 41/42 (-TTCT) อย่างละ 1 ราย พบ beta$^+$-thalassemia mutation จำนวน 5 ราย ได้แก่ codon 126 (GTG>GGG) หรือ Hb Dhonburi 3 ราย ชนิด nt -31 (A>G) และ nt -28 (A>G) อย่างละ 1 ราย ที่เหลืออีก 34 ราย ไม่พบ beta-globin mutation ข้อมูลสัดส่วนของ Hb A_2 และ MCV ของ พาหะ beta-thalassemia ที่ตรวจพบทั้ง 7 ราย แสดงดัง Table 1 จากจำนวนคู่สามีภรรยาที่ส่งตรวจเพื่อค้นหาคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia ทั้งหมด 7,110 คู่ (14,220 ราย) จากเกณฑ์การวินิจฉัยเดิมพบพาหะ beta-thalassemia ทั้งสิ้น 511 ราย (ร้อยละ 3.6) จากเกณฑ์การวินิจฉัยใหม่พบพาหะ beta-thalassemia เพิ่มขึ้น 41 ราย คิดเป็นจำนวนที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 8.0 ของจำนวนพาหะ beta-thalassemia ที่พบทั้งหมด

จากตัวอย่างพาหะ beta-thalassemia จำนวน 41 ราย ดังกล่าว เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลการวินิจฉัยของคู่สมรสเพื่อกำหนดคู่เสี่ยง พบคู่เสี่ยงของ Hb E/beta-thalassemia เพิ่มขึ้น 26 คู่ จากเดิมที่พบคู่เสี่ยง beta-thalassemia ทั้งสิ้น 262 คู่ คิดเป็นจำนวนคู่เสี่ยงที่พบเพิ่มขึ้นในเบื้องต้นร้อยละ 9.9 และจากการตรวจยืนยันพาหะ beta-thalassemia ด้วยเทคนิค DNA สามารถยืนยันคู่เสี่ยง Hb E/beta-thalassemia จำนวน 4 คู่ ประกอบด้วย codon 41/42 (-TTCT) ร่วมกับ Hb E 1 คู่ IVS-1 nt 1 (G>T) ร่วมกับ Hb E 1 คู่ nt -28 (A>G) ร่วมกับ Hb E 1 คู่ และ codon 126 (GTG>GGG) ร่วมกับ Hb E 1 คู่ คิดเป็นจำนวนคู่เสี่ยงจริงที่พบเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.5 จำนวนพาหะและคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia ที่พบจากเกณฑ์การวินิจฉัยเดิมเทียบกับเกณฑ์ใหม่แสดงดัง Table 2

วิจารณ์

Borderline Hb A_2 หรือระดับ Hb A_2 ที่มากกว่าคนปกติแต่น้อยกว่าเกณฑ์ที่ใช้วินิจฉัยพาหะของ beta-thalassemia เป็นปัญหาที่พบอยู่เป็นประจำในการตรวจ Hb typing ทั่วโลก ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นการตรวจ phenotype ของตัวอย่าง ซึ่งมีความผันแปรจากปัจจัยต่างๆ สัดส่วนของ borderline Hb A_2 ในประชากรมีความแตกต่างกันตามเชื้อชาติ และพิสัย (range) ของระดับ Hb A_2 ที่กำหนดในแต่ละการศึกษา มีรายงานจากประเทศมาเลเซียพบสัดส่วนของ borderline Hb A_2 (กำหนดพิสัยร้อยละ 3.0-3.9) ร้อยละ 3.4 ของกลุ่มประชากรที่ส่งตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมีย[2] รายงานจากประเทศอิตาลีพบสัดส่วนของ borderline Hb A_2 (กำหนดพิสัยร้อยละ 3.1-3.9) ร้อยละ 16.8 ของกลุ่มประชากรที่ส่งตรวจคัดกรองพาหะของ beta-thalassemia[8] สำหรับการศึกษานี้ซึ่งกำหนดพิสัยของ Hb A_2 ที่ต้องการศึกษาในช่วงร้อยละ 3.6-3.9 เพื่อศึกษาผลกระทบจากเกณฑ์ใหม่ พบสัดส่วนของกลุ่มตัวอย่างดังกล่าวเพียงร้อยละ 0.3 (41 จาก 14,220 ตัวอย่าง) ของประชากรหญิงตั้งครรภ์และสามีที่ส่งตัวอย่างเลือดตรวจเพื่อกำหนดคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia จะเห็นได้ว่าสัดส่วนของกลุ่มตัวอย่างดังกล่าวมีจำนวนน้อย สอดคล้องกับ

Table 1 Fraction of hemoglobin A_2 values, mean corpuscular volume and alpha-thalassemia genotype of the seven genetically proven beta-thalassemia heterozygotes

Beta-thalassemia mutation	Hb A_2 (%)	MCV (fL)	Alpha-thalassemia genotype
Beta^0-thalassemia			
IVS-1 nt 1 (G>T)	3.7	71.2	αα/αα
Codon 41/42 (-TTCT)	3.9	71.0	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha^{CS}\alpha$
Beta$^+$-thalassemia			
nt-31 (A>G)	3.8	71.9	αα/αα
nt-28 (A>G)	3.9	75.9	αα/αα
Codon 126 *(GTG>GGG)*	3.8	66.0	αα/αα
Codon 126 *(GTG>GGG)*	3.8	72.1	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$
Codon 126 *(GTG>GGG)*	3.9	98.0	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$

Hb, hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; nt, nucleotide

Table 2 Number of beta-thalassemia carriers and at-risk couples for beta-thalassemia comparing between the two cut-off values

Hb A2 cut-off values (%)	Number of beta-thalassemia carriers	Number of at-risk couples
≥ 4.0	511	262
> 3.5	552	288
Number of differences	**41 (8.0%)**	**26 (9.9%)**

Hb, hemoglobin

รายงานจากภาคเหนือก่อนหน้านี้ที่พบ borderline Hb A_2 (พิสัยร้อยละ 3.6-3.9) เพียง 13 ตัวอย่าง จากตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจเพื่อกำหนดคู่เสี่ยงของธาลัสซีเมียทั้งหมด 2,193 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.6)[6] แสดงให้เห็นว่าผลกระทบจากการปรับเกณฑ์การวินิจฉัยพาหะ beta-thalassemia ดังกล่าวมีไม่มากนักในแง่ของภาระงานที่เพิ่มขึ้นในพื้นที่เขตภาคเหนือของประเทศไทย

สำหรับสัดส่วนของ beta-globin mutation ที่พบจากกลุ่มตัวอย่าง borderline Hb A_2 ในแต่ละการศึกษามีความแตกต่างตามเชื้อชาติเช่นกัน โดยการศึกษาจากมาเลเซียที่กล่าวถึงข้างต้นพบ beta-globin mutation จำนวน 37 จาก 117 ตัวอย่าง (ร้อยละ 31.6) โดยพบ Hb Malay มากที่สุดถึง 17 ตัวอย่าง และพบ IVS-1 nt 1 (G>A) ซึ่งจัดเป็น beta^0-thalassemia mutation รองลงมาจำนวน 9 ตัวอย่าง[2] ส่วนการศึกษาจากอิตาลีที่กล่าวถึงแล้วเช่นกันพบ beta-globin mutation จำนวน 60 จาก 410 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.6) โดยพบ IVS-1 nt 6 (T>C) ถึง 24 ตัวอย่าง promoter mutation [-101 (C>T) และ -92 (C>T)] 20 ตัวอย่าง และพบ beta^0-thalassemia ร่วมกับ delta-thalassemia mutation 11 ตัวอย่าง[8] มีการศึกษาในจีนซึ่งกำหนดพิสัยของ Hb A_2 ที่ศึกษาในช่วงร้อยละ 3.3-4.0 จาก 165 ตัวอย่าง พบ beta-globin mutation เพียง 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.4) เป็น beta$^+$-thalassemia mutation 3 ตัวอย่าง [nt -50 (G>T) และ nt -31 (A>C)] และพบพาหะ beta^0-thalassemia ร่วมกับ alpha^0-thalassemia 1 ตัวอย่าง[9] จะเห็นได้ว่าสัดส่วนและชนิดของ beta-globin mutation ที่พบในกลุ่มตัวอย่าง borderline Hb A_2 แม้จะมีความแตกต่างในแต่ละเชื้อชาติ แต่ชนิดของ mutation ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม beta$^+$-thalassemia อย่างไรก็ดีทั้งสามการศึกษายังคงพบ beta^0-thalassemia mutation ร่วมด้วย โดยการศึกษาจากอิตาลีและจีนแสดงให้เห็นความสำคัญของ delta-thalassemia และ alpha^0-thalassemia mutation ที่พบร่วม ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้ระดับ Hb A_2 ของพาหะ beta-thalassemia ลดลงมาอยู่ในเกณฑ์ของ borderline Hb A_2 สำหรับการศึกษานี้พบ beta-globin mutation จำนวน 7 จาก 41 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.1) โดยพบพาหะ beta$^+$-thalassemia 5 ตัวอย่าง ได้แก่ Hb Dhonburi 3 ราย และพาหะของ nt -31 (A>G) และ nt -28 (A>G) อย่างละ 1 ราย สอดคล้องกับรายงานในภูมิภาคอื่นของไทยซึ่งพบพาหะของ Hb Dhonburi ในกลุ่มตัวอย่างที่มีระดับ Hb A_2 ในช่วงร้อยละ 3.5-4.0 ได้บ่อยที่สุด[5,6] อย่างไรก็ดีการศึกษานี้ยังพบพาหะ beta^0-thalassemia 2 ตัวอย่าง ได้แก่ IVS-1 nt 1 (G>T) และ codon 41/42 (-TTCT) และจากการตรวจหา alpha-thalassemia mutation เพิ่มเติมในตัวอย่างทั้ง 7 ราย พบ alpha$^+$-thalassemia allele (3.7 kb deletion) ร่วมด้วยในตัวอย่างที่เป็นพาหะของ Hb Dhonburi และพบ Hb Constant Spring ในตัวอย่างที่เป็นพาหะชนิด codon 41/42 (-TTCT) ข้อมูลแสดงดัง Table 1

จากการเปลี่ยนเกณฑ์การวินิจฉัยพาหะของ beta-thalassemia โดยใช้ระดับ Hb A_2 มากกว่าร้อยละ 3.5 ทำให้พบจำนวนพาหะเพิ่มขึ้นร้อยละ 8.0 และหากนำผลการตรวจที่ได้มาพิจารณาร่วมกับผลการตรวจของคู่สมรสจะพบคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia เพิ่มขึ้นร้อยละ 9.9 ในส่วนของภาระงานที่เพิ่มขึ้น เฉพาะพาหะ beta-thalassemia ที่มีคู่สมรสเป็นพาหะ beta-thalassemia หรือ Hb E เท่านั้น ที่จำเป็นต้องตรวจหา beta-globin mutation เพื่อยืนยันการวินิจฉัยคู่เสี่ยงและดำเนินการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อวินิจฉัยโรคของเด็กในครรภ์ ดังนั้นเมื่อมีคู่เสี่ยงเพิ่มขึ้นจำนวน 26 คู่ จากการใช้เกณฑ์ระดับ Hb A_2 มากกว่าร้อยละ 3.5 จึงคิดเป็นภาระงานการตรวจยืนยันการวินิจฉัยคู่เสี่ยงด้วยเทคนิค DNA ที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 9.9 จากจำนวนคู่เสี่ยงเดิมที่พบ ซึ่งดูไม่มากนัก โดยพบคู่เสี่ยงจริง 4 คู่ อย่างไรก็ดีการวินิจฉัยพาหะ beta-thalassemia เพิ่มขึ้นดังกล่าวทำให้มีผลบวกลวงเพิ่มขึ้น และอาจนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยไม่จำเป็นเพิ่มขึ้นในคู่สามีภรรยาซึ่งตรวจไม่พบ beta-globin mutation อีก 22 คู่ ที่เหลือ โดยเฉพาะหากไม่ได้ทำการตรวจยืนยัน beta-globin mutation ก่อนทำการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด หรือสูติแพทย์อาจตัดสินใจทำการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดแม้จะตรวจไม่พบ beta-globin mutation โดยเลือกใช้

Table 3 Incremental numbers of beta-thalassemia carriers detected and at-risk couples for beta-thalassemia identified using different cut-off values

Cutt-off values (%)	Incremental numbers of carriers detected (%)*	Incremental numbers of at-risk couples (workload) identified (%)**	Incremental numbers of true at-risk couples identified (%)**
> 3.5	41 (8.0)	26 (9.9)	4 (1.5)
> 3.6	24 (4.1)	16 (6.1)	4 (1.5)
> 3.7	18 (3.5)	11 (4.2)	3 (1.1)
> 3.8	13 (2.5)	8 (3.1)	2 (0.8)

*Compared with numbers of carriers detected using cut-off value of 4.0% or greater

**Compared with numbers at-risk couples identified using cut-off value of 4.0% or greater

วิธี cordocentesis และการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC เนื่องจากยังมีความกังวลที่อาจได้เด็กที่เป็นโรค

จากข้อมูลที่ได้ผู้วิจัยได้ลองวิเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบภาระงานและคู่เสี่ยงจริงที่เพิ่มขึ้นจากการใช้เกณฑ์ระดับ Hb A_2 ที่ต่างกัน ตั้งแต่มากกว่าร้อยละ 3.5 จนถึงมากกว่าร้อยละ 3.8 โดยพบว่าเกณฑ์ระดับ Hb A_2 มากกว่าร้อยละ 3.6 ทำให้เกิดภาระงานเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด ในขณะที่ยังได้คู่เสี่ยงจริงเพิ่มขึ้นเท่ากับการใช้เกณฑ์มากกว่าร้อยละ 3.5 ข้อมูลแสดงดัง Table 3

การตรวจวิเคราะห์หาสาเหตุของ borderline Hb A_2 ในการศึกษานี้ทำการตรวจหาเฉพาะ beta-globin mutation ไม่ได้ทำการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมอื่นๆ นอก beta-globin gene ซึ่งอาจทำให้ระดับ Hb A_2 สูงขึ้น โดยเฉพาะ KLF1 mutation ซึ่งมีรายงานจากอิตาลี[10] และจีน[9] ที่พบเป็นสาเหตุของ borderline Hb A_2 ได้บ่อย รวมถึง alpha-globin triplication ทั้งนี้เนื่องจากจุดประสงค์ของการศึกษาต้องการเพียงตรวจหา beta-globin mutation ที่มีโอกาสถ่ายทอดไปสู่บุตร และทำให้เกิดภาวะ homozygote หรือ compound heterozygote ของ beta-thalassemia ในกรณีที่คู่สมรสเป็นพาหะของ beta-thalassemia หรือ Hb E เท่านั้น

สรุป

การปรับเกณฑ์สัดส่วนของ Hb A_2 ในการวินิจฉัยพาหะของ beta-thalassemia ทำให้มีภาระงานในการตรวจยืนยัน beta-thalassemia mutation เพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยสามารถวินิจฉัยคู่เสี่ยงของ beta-thalassemia เพิ่มขึ้น การแก้ปัญหาผลลบลวงในการวินิจฉัยพาหะ beta-thalassemia โดยการปรับเกณฑ์ดังกล่าวทำให้มีผลบวกลวงเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ดีภาระงานที่เกิดจากผลบวกลวงที่ได้ดูไม่มากนักเมื่อเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจเพื่อค้นหาคู่เสี่ยงโดยพบคู่เสี่ยงเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ผลบวกลวงดังกล่าวอาจนำไปสู่การวินิจฉัยก่อนคลอดโดยไม่จำเป็นเพิ่มขึ้นเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

1. *Galanello R, Barella S, Ideo A, Gasperini D, Rosatelli C, Paderi L, et al. Genotype of subjects with borderline haemoglobin A_2 levels: implication for beta-thalassemia carrier screening. Am J Hematol. 1994;46:79-81.*
2. *Rosnah B, Nani Shahida S, Mohd Nazri H, Marini R, Noor Haslina MN, Shafini MY, et al. The Diagnosis of Beta Thalassemia with Borderline Hb A_2 Level among Kelantan Population. J Blood Disord Transfus. 2017;8:5.*
3. *Steinberg MH, Adams JG, 3rd. HaemoglobinA_2: origin, evolution and aftermath. Blood. 1991;78:2165-77.*
4. *Practice Guideline in Laboratory for Prevention and Control of Thalassemia. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 2016.*
5. *Duangrueng S, Sangkitporn S, Panachamnong N, Kakunmalee C, Nuttabut P, Sangkitporn S. The study of beta-thalassemia mutation in samples with Hb A_2 fraction of 3.5-4.0%. Abstract of the 22nd National Thalassemia Conference; 2017 Jul 6-7; Bangkok, Thiland. p. 47.*
6. *Chaweephisal P, Phusua A, Fanhchaksai K, Sirichotiyakul S, Charoenkwan P. Prevalence and genotypes of beta-thalassemia carriers in northern Thai population with borderline hemoglobin A_2 levels. Abstract of the 23rd National Thalassemia Conference; 2018 Sep 4-6; Bangkok, Thailand. p. 38.*
7. *Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguansermsri T. Analysis of beta-thalassemia mutations in northern Thailand using an automated fluorescence DNA sequencing technique. Hemoglobin. 2003;27:89-95.*
8. *Giambona A, Passarello C, Vinciguerra M, Muli RL, Teresi P, Anza M, et al. Significance of borderline hemoglobin A_2 values in an Italian population with a high prevalence of beta-thalassemia. Haematologica. 2008; 93:1380-4.*
9. *Lou JW, Li DZ, Zhang Y, He Y, Sun MN, Ye WL, et al. Delineation of the molecular basis of borderline hemoglobin A_2 in Chinese individuals. Blood Cells Mol Dis. 2014;53:261-4.*
10. *Perseu L, Satta S, Moi P, Demartis FR, Manunza L, Sollaino MC, et al. KLF1 gene mutations cause borderline HbA_2. Blood. 2011;118:4454-8.*