การศึกษา Eosin-5′-maleimide (EMA) binding test ในผู้ป่วยเด็กโรคผนังเม็ดเลือดแดงแตกง่าย ที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ภัทรมน อึ่งบำเหน็จ[1,2], มนัสวี ปราบพาล[1,2], เยาวรีย์ กิตติกัลยาวงศ์[2],
สุภานัน เลาหสุรโยธิน[1,2] และดารินทร์ ซอโสตถิกุล[1,2]

บทคัดย่อ

ความเป็นมา : กลุ่มโรคผนังเม็ดเลือดแดงแตกง่ายที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (hereditary red blood cell membrane defect) เป็นโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมก่อให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างผนังเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างที่ผิดปกติและแตกง่าย โรคที่พบบ่อยในกลุ่มนี้ ได้แก่ hereditary spherocytosis (HS), southeast asian ovalocytosis (SAO), hereditary elliptocytosis (HE) และ hereditary pyropoikilocytosis (HPP) การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคกลุ่มนี้คือ osmotic fragility test (OFT) แต่เป็นวิธีที่มีความความไวในการวินิจฉัยที่จำกัด และใช้ระยะเวลาในการตรวจนาน ดังนั้นจึงได้ศึกษาการตรวจด้วยวิธีใหม่คือ Eosin-5′-maleimide (EMA) binding test เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยให้ถูกต้องและรวดเร็ว

วิธีการศึกษา : ศึกษาการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี EMA binding test ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น hereditary red blood cell membrane defect ทุกราย รวม 14 ราย (กลุ่มผู้ป่วย HS 7 ราย กลุ่มผู้ป่วย SAO 4 ราย กลุ่มผู้ป่วย HE 3 ราย) กลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะโลหิตจางจากการแตกของเม็ดเลือดแดงอื่นๆ (other hemolytic anemias) จำนวน 39 ราย และกลุ่มคนปกติ (normal control) จำนวน 93 ราย

ผลการศึกษา : ผลการตรวจ EMA binding test พบว่ากลุ่มผู้ป่วย HS ได้ค่า % ของ Mean Fluorescence Intensity (MFI) = 68.08 (SD 8.54) กลุ่มผู้ป่วย SAO ได้ค่า %MFI = 65.38 (SD 5.21) กลุ่มผู้ป่วย HE ได้ค่า %MFI = 89.36 (SD 5.57) กลุ่มผู้ป่วย hemolytic anemia อื่นๆ ได้ค่า %MFI = 96.10 (SD 6.94) กลุ่ม normal control ได้ค่า %MFI = 100.33 (SD 5.55) ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วย HS และ SAO แตกต่างกับกลุ่ม normal control และกลุ่มผู้ป่วย hemolytic anemia อื่นๆ และกลุ่มผู้ป่วย HE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< .001) ตามลำดับ

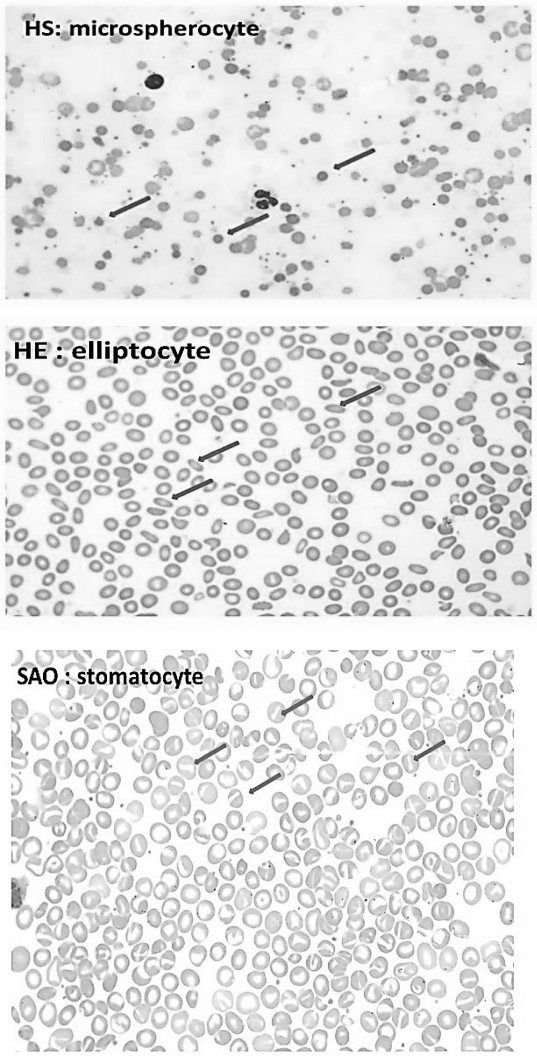
สรุปผลการศึกษา : การตรวจด้วยวิธี EMA binding test สามารถแยกกลุ่มผู้ป่วย HS และกลุ่มผู้ป่วย SAO ออกจากกลุ่มผู้ป่วย hemolytic anemia อื่นๆ และกลุ่มผู้ป่วย HE ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้สำหรับวินิจฉัยผู้ป่วย HS และ SAO

คำสำคัญ : Hereditary red blood cell membrane defect, hereditary spherocytosis, Eosin-5′-maleimide binding test, osmotic fragility test

[1] *กลุ่มวิจัยทางคลินิกเพื่อการรักษาโรคเลือดและมะเร็งเด็กแบบองค์รวม ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
[2] *สาขาวิชาโลหิตวิทยาและมะเร็งเด็ก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

บทนำ

กลุ่มโรคผนังเม็ดเลือดแดงแตกง่ายที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (hereditary red cell membrane defects) เป็นโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมก่อให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างที่ผิดปกติจึงทำให้เม็ดเลือดแดงง่ายโรคที่พบบ่อยในกลุ่มนี้ ได้แก่ hereditary spherocytosis (HS), hereditary elliptocytosis (HE), southeast asian ovalocytosis (SAO) และhereditary pyropoikilocytosis (HPP)[1] ผู้ป่วยมักมาด้วยอาการซีด เหลือง ร่วมกับการซักประวัติคนในครอบครัว ที่มีประวัติโรคโลหิตจางที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงเรื้อรัง (chronic hemolytic anemia) หรือภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (hemolytic crises) ภาวะตัวเหลือง หรือม้ามโตโดยไม่ทราบสาเหตุ ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ คือ การตรวจเสมียร์เลือดแล้วพบ spherocyte, microspherocyte, elliptocyte, stomatocyte และ fragmented RBC (รูปที่ 1) การตรวจพบค่า mean cell volume (MCV) ที่ค่าน้อยกว่าปกติ แต่ค่า mean corpuscular hemoglobin (MCH) มากกว่าปกติ[2-5] และการตรวจ osmotic fragility test (OFT) เป็นการตรวจวัดการแตกของเม็ดเลือดแดงใน hypotonic solution ใช้ยืนยันการวินิจฉัยผู้ป่วย HS ในอดีตใช้การตรวจ OFT เพื่อยืนยันการวินิจฉัยผู้ป่วย HS เพียงโรคเดียวเท่านั้น และวิธีนี้มีขั้นตอนยุ่งยากและใช้เวลาการตรวจนาน (5-6 ชั่วโมง) รวมทั้งใช้ปริมาณเลือดจำนวนมากแต่ละครั้ง (4-6 ml) จึงไม่เหมาะกับคนไข้เด็กเล็กที่มีภาวะซีดมาก อีกทั้งการรายงานผลเป็นแบบเชิงคุณภาพ (qualitative) และ มีความไว (sensitivity) ต่ำเพียงร้อยละ 68 เท่านั้น[5] นอกจากนี้อาจมีการเกิดผลลบปลอม (false negative) ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับเลือดก่อนการตรวจวินิจฉัยไม่นาน ทำให้การวินิจฉัยโรคนี้เป็นไปได้ยากในผู้ป่วยที่มีภาวะซีดมากและต้องได้รับเลือดบ่อยๆ ตั้งแต่แรกเกิด จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงต้องศึกษาหาวิธีการตรวจใหม่ คือ การตรวจด้วย eosin-5′-maleimide (EMA) binding test ซึ่งเป็นการย้อมโปรตีน band 3 บนผนังเม็ดเลือดแดงด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ สามารถให้การวินิจฉัยโรคในกลุ่มนี้ ได้แก่ HS, HPP และ SAO อีกทั้งยังใช้ปริมาณเลือดในการตรวจที่น้อยมากเพียง 0.1 mL มีความไว (sensitivity) สูงถึงร้อยละ 90[6] และการรายงานผลเป็นแบบเชิงปริมาณ (quantitative) แต่อาจเกิดผลลบปลอมได้เช่นเดียวกับวิธี OFT คำถามการวิจัยในครั้งนี้ คือ การตรวจด้วยวิธี EMA binding test สามารถยืนยันการวินิจฉัยโรคผนังเม็ดเลือดแดงแตกง่ายที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (hereditary red cell membrane defects) ได้ และ ทำการศึกษา EMA binding test ภายหลังจากการรับเลือดเป็นระยะเวลาต่างๆ กัน เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจหลังจากได้รับเลือด

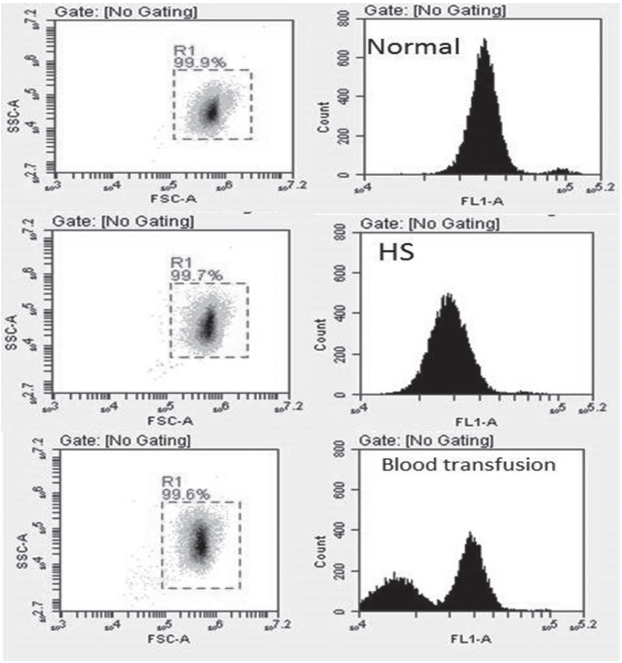


รูปที่ 1 microspherocyte, elliptocyte และ stomatocyte

วิธีการศึกษา

ตรวจ EMA binding test จากตัวอย่างเลือดของผู้ร่วมวิจัย (blood samples) 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วย HS กลุ่มที่ 2 ผู้ป่วย SAO กลุ่มที่ 3 ผู้ป่วย HE กลุ่มที่ 4 กลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะโลหิตจางจากการแตกของเม็ดเลือดแดงอื่นๆ (other hemolytic anemias) โดยนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (normal control) โดยเจาะเลือดผู้เข้าร่วมวิจัยเพื่อทำ EMA binding test และบันทึกลงในแบบฟอร์มการเก็บข้อมูลการวิจัย วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การเก็บรวบรวมข้อมูลทั้ง เพศ อายุ ผลการตรวจ complete blood count (CBC) และค่า % Mean Fluorescence Intensity (MFI) วิเคราะห์ข้อมูลและสถิติโดยสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics) โดยใช้ Fisher exact test หรือ Pearson X^2 test เปรียบเทียบความสัมพันธ์ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการในแต่ละกลุ่ม และเปรียบเทียบค่า %MFI ในกลุ่มผู้ป่วย HS หลังได้รับเลือดในช่วงเวลาที่แตกต่างกันโดยใช้ Mann-Whitney *U* test โดยโปรแกรม GraphPad Prism version 9.2.0 (332)

การตรวจ EMA binding test (รูปที่ 2) เป็นวิธีการย้อมสีโปรตีนบนผนังของเม็ดเลือดแดง โดยสี EMA จะไปจับที่โปรตีน band 3 แล้วนำไปวัดค่า MFI ด้วยเครื่อง flow cytometer (Becton Dickinson BD Accuri C6 flow cytometer) โดยทำการศึกษาในผู้เข้าร่วมวิจัยเทียบกับกลุ่มควบคุม 3-5 รายในแต่ละครั้ง วิธีการ คือนำ EDTA blood 0.1 mL ล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS pH 7.4) 2 ครั้ง ปั่นล้างเสร็จแล้วนำมาผสมกับ EMA 0.5 mg/mL (Sigma-Aldrich Company, Poole, Dorset, UK) ปิดฝาแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นนำไปปั่นล้างด้วย PBS-bovine serum albumin (BSA) solution (0.5% BSA in PBS) 3 ครั้ง แล้วเจือจางใน PBS–BSA 1.4 mL วัดค่า MFI ใน FL1 channel จากนั้นหาค่าเฉลี่ย MFI ของ normal control แล้วนำค่า MFI ของผู้ป่วยมาเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ย normal control โดยคำนวณเป็น %MFI การแปลผล ค่า %MFI ของผู้ป่วย HS และ SAO จะน้อยกว่า 80 % ของค่าคนปกติ [7,8,9]



รูปที่ 2 แสดงค่า MFI ของ normal control ผู้ป่วย HS และผู้ป่วย HS ที่ได้รับเลือด

ผลการศึกษา

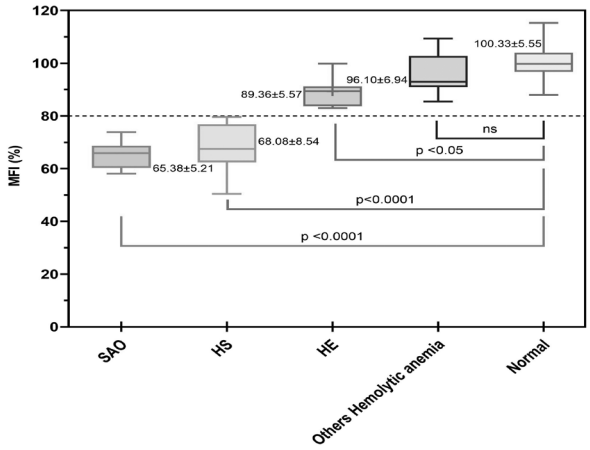
ศึกษาการตรวจ EMA binding test ในเลือดผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น hereditary red blood cell membrane defects จำนวนรวม 14 ราย โดยมีผู้ป่วย HS 7 ราย ผู้ป่วย SAO 4 ราย ผู้ป่วย HE 3 ราย และ hemolytic anemia อื่นๆ 39 ราย กลุ่ม normal control จากการเก็บข้อมูลจากประวัติผู้ร่วมวิจัยพบว่ากลุ่มผู้ป่วย HS พบว่ามีค่า Hemoglobin เฉลี่ย 8.3 (6.8-10.7) g/dL ค่า MCHC เฉลี่ย 34.6 (27.4-35.6) g/dL และค่า Hemoglobin/MCHC ratio 0.24 (0.21-0.31) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$) กับกลุ่ม normal control ซึ่งมีค่า Hemoglobin เฉลี่ย 13.0 (11.2-16.5) g/dL ค่า MCHC เฉลี่ย 33.7 (32.1-35.7) g/dL และค่า Hemoglobin/MCHC ratio 0.39 (0.33-0.43) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มผู้ป่วย SAO กลุ่มผู้ป่วย HE และ กลุ่มผู้ป่วย hemolytic anemia อื่นๆ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงประวัติและผลการตรวจ CBC ของผู้ร่วมวิจัย

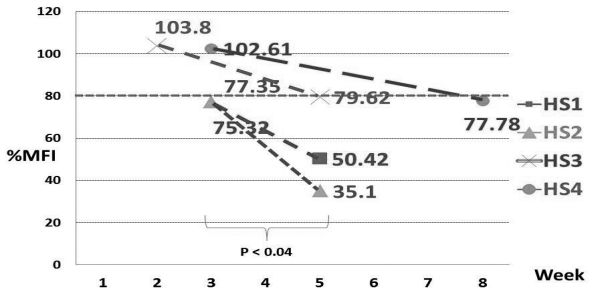
ประวัติผู้ร่วมวิจัย	กลุ่มผู้ร่วมวิจัย				
	HS (1) (n=7)	SAO (2) (n=4)	HE (3) (n=3)	Other hemolytic (4) anemias (n=39)	Normal control (5) (n=93)
เพศ, หญิง/ชาย	5/2	2/2	2/1	23/16	43/50
อายุ, median (range), ปี	13.(5-20)	5 (1-29)	2 (1-4)	7 (1-19)	11 (4-31)
Hemoglobin, median(range), g/dL	8.3 (6.8-10.7)*	12.7 (9.3-14.7)	9.9 (8.4-11.6)	9.0 (5.5-13.9)	13.0 (11.2-16.5)
MCV, median (range), fL	75.8 (49.0-82.7)	68.25 (58.3-88.3)	72.2 (59.7-80.4)	68.1 (43.5-85.4)	83.6 (77.1-102.0)
MCHC, median (range), g/dL	34.6 (27.4-35.6)*	33..4 (25.8-35.7)	34.3 (31.1-35.8)	32.5 (29.7-36.1)	33.7 (32.1-35.7)
Hemoglobin/MCHC ratio, median (range)	0.24 (0.21-0.31)*	0.36 (0.29-0.47)	0.29 (0.25-0.32)	0.27 (0.25-0.32)	0.39 (0.33-0.43)

ฮีโมโกลบิน, hemoglobin (Hb); ขนาดเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย, mean corpuscular volume (MCV); ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)

ผลการตรวจ EMA binding test พบว่ากลุ่มผู้ป่วย HS ได้ค่า %MFI 50.42-79.62, mean = 68.08 (SD 8.54) กลุ่มผู้ป่วย SAO ได้ค่า %MFI 58.2-73.83, mean = 65.38 (SD 5.21) กลุ่มผู้ป่วย HE ได้ค่า %MFI 83.02-99.83, mean = 89.36 (SD 5.57) กลุ่มผู้ป่วย hemolytic anemia อื่นๆ ได้ค่า %MFI 85.47–109.35, mean = 96.10 (SD 6.94) และกลุ่ม normal control ได้ค่า %MFI 87.99–115.28, mean = 100.33 (SD 5.55) เมื่อเปรียบเทียบค่า %MFI ของกลุ่มผู้ป่วย HS และ SAO พบว่ามีแตกต่างกับกลุ่ม normal control, กลุ่มผู้ป่วย hemolytic anemia อื่นๆ และกลุ่มผู้ป่วย HE อย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ (P<0.001) จากการเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วย hemolytic anemia อื่นๆ และกลุ่ม HE ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่ม normal control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3) ผลการศึกษา EMA binding test ในกลุ่มผู้ป่วย HS ภายหลังจากการรับเลือดในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 2-3 สัปดาห์, 5 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ หลังการได้รับเลือด แสดงดังรูปที่ 4 ระยะห่างหลังจากที่ได้รับเลือดมีผลต่อค่า %MFI โดยพบว่าการตรวจ EMA binding test หลังได้รับเลือดเป็นเวลาอย่างน้อย 5 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาหลังจากการได้รับเลือดที่เหมาะสมในการตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค HS



รูปที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบค่า %MFI กลุ่มผู้ป่วย SAO, HS, HE, others hemolytic anemia และ normal control



% mean fluorescent intensity (%MFI) และระยะเวลาหลังได้รับเลือดแต่ละสัปดาห์ (Week)

รูปที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบค่า %MFI ของผู้ป่วย HS และระยะเวลาหลังได้รับเลือด

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การตรวจ EMA binding test สามารถแยกผู้ป่วยในกลุ่มผู้ป่วย HS และ SAO ออกจากกลุ่มผู้ป่วย hemolytic anemia อื่นๆ กลุ่มผู้ป่วย HE และกลุ่ม normal control ได้อย่างชัดเจน ดังนั้น EMA binding test มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้สำหรับวินิจฉัยผู้ป่วย HS และ SAO นอกจากจะเพิ่มประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคแล้ว การตรวจด้วยวิธีนี้สามารถตรวจคัดกรองในเด็กเล็กได้เป็นอย่างดี เพราะใช้เลือดปริมาณน้อยมากสามารถเจาะเลือดจากปลายนิ้วหรือจากส้นเท้าของเด็กแรกเกิดก็เพียงพอ

สำหรับการตรวจวินิจฉัย และที่สำคัญยังช่วยลดระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยลงถึงสองเท่า จากวิธีดั้งเดิม คือ OFT และสามารถนำมาใช้ทดแทนวิธีดั้งเดิมได้เป็นอย่างดี ส่วนในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับเลือดจะทำให้ผลการตรวจเป็นผลลบปลอมเนื่องจากค่าที่ได้จะมาจากการวัดค่าเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาค จากการศึกษากลุ่มผู้ป่วย HS ที่ได้รับเลือดในช่วงเวลาต่างๆ กันพบว่าภายหลังได้รับเลือดสัปดาห์ที่ 2 ค่า %MFI ยังอยู่ในระดับสูงใกล้เคียงกับคนปกติ แต่ภายหลังจากได้รับเลือดประมาณ 5 สัปดาห์พบว่าค่า % MFI จะกลับมาต่ำกว่า 80% หากเป็นผู้ป่วยในกลุ่มที่มีภาวะซีดมากและเม็ดเลือดแดงแตกง่าย (รูปที่ 4) จำเป็นต้องให้เลือดในทันที หากจำเป็นที่จะต้องตรวจวินิจฉัยกลุ่มโรคผนังเม็ดเลือดแดงแตกง่ายที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (hereditary red cell membrane defect) ควรจะเว้นระยะหลังจากให้เลือดไปแล้ว 5 สัปดาห์ จะเป็นช่วงเวลาเหมาะสม จากการศึกษานี้มีจำนวนผู้ป่วยที่ทำการศึกษาน้อย จึงควรมีการศึกษาผู้ป่วยในกลุ่มนี้เพิ่มเติมอีกในภายหลังเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยที่ถูกต้องและเหมาะสมยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1994; 23: 787-818.
2. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N: Hereditary spherocytosis. Lancet 2008; 372: 1411–1426.
3. Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology: Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. Br J Haematol 2012; 156: 37–49.
4. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. The Lancet. 2008; 372 (9647):1411-1426.
5. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. Br J Haematol 2008; 141:367-75.
6. Narla J, Mohandas N. Red cell membrane disorders. Int J Lab Hematol 2017;39 Suppl1:47-52.
7. Bolton-Maggs PH, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King MJ. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. Br J Haematol 2004; 126:455-74.
8. R D Arora , J Dass , S Maydeo , V Arya , N Radhakrishnan , A Sachdeva , J Kotwal , M Bhargava. Flow cytometric osmotic fragility test and eosin-5'-maleimide dye-binding tests are better than conventional osmotic fragility tests for the diagnosis of hereditary spherocytosis. Int J Lab Hematol. Int J Lab Hematol 2018 Jun; 40(3):335-342.
9. Sang Hyuk Park , Chan-Jeoung Park, Bo-Ra Lee , et all. Comparison study of the eosin-5'-maleimide binding test, flow cytometric osmotic fragility test, and cryohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. Am J Clin Pathol 2014 Oct; 142(4):474-84

Eosin-5′-maleimide (EMA) binding test in hereditary red blood cell membrane defects patients in Chulalongkorn Memorial Hospital

Pattramon Aungbamnet[1,2], Manussavee Prapphal[1,2], Yaowaree Kittikalayawong[2] Supanun Lauhasurayothin[1,2] and Darintr Sosothikul[1,2*]

[1]*Clinical research for holistic management in Pediatric Hematology and Oncology*

[2]*Department of Pediatrics Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University*

Abstract

Objective: Hereditary red blood cell membrane defects are inherited disease due to mutations in various membrane or skeletal proteins. The common congenital red blood cell membrane defects included hereditary spherocytosis (HS), southeast asian ovalocytosis (SAO), hereditary elliptocytosis (HE) and hereditary pyropoikilocytosis (HPP). The old and the classic methods used for the diagnosis is based on osmotic fragility test (OFT). OFT is labor intensive and lack of sensitivity. We evaluated the performance the Eosin-5′-maleimide (EMA) binding test to replace the classic OFT.

Method: Fourteen patients with hereditary red blood cell membrane defects (7 cases with HS, 4 cases with SAO and 3 cases with HE) were enrolled. All these patients and 39 cases of other hemolytic anemia underwent EMA binding test. 93 cases were analyzed as the control group.

Result: In the EMA binding test, %Mean Fluorescence Intensity (MFI) in HS cases = 68.08 (SD 8.54), HE cases = 89.36 (SD 5.57), other hemolytic anemia cases = 96.10 (SD 6.94) and normal control groups = 100.33 (SD 5.55), respectively. In HS and SAO cases, the %MFI were significantly low compared to HE cases, other hemolytic anemia cases and normal control groups, respectively ($P < .001$).

Conclusion: EMA binding test was an accurate and relative faster method to confirm diagnosed HS and SAO.

Keywords: Hereditary red blood cell membrane defects, hereditary spherocytosis, Eosin-5′-maleimide binding test.