นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำ ของเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน Capillarys 2 Flex Piercing สำหรับวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ

เชาวณี วังช่วย และ ชวดี นพรัตน์
หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ *ตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Capillarys 2 Flex Piercing ซึ่งอาศัยหลักการ capillary electrophoresis (CE) โดยเปรียบเทียบอ้างอิงเดิมคือวิธี high pressure liquid chromatography (HPLC)* ***วัสดุและวิธีการ*** *ศึกษาในตัวอย่าง EDTA blood ที่ส่งตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน จำนวน 344 ราย* ***ผลการศึกษา*** *ในคนปกติ ผู้มียีนแฝง ผู้ป่วยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ ผลการวิเคราะห์ปริมาณ HbA_2, Hb E และ Hb F จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) กับผลการวิเคราะห์โดยวิธีอ้างอิง การแปลผลการตรวจตรงกัน 337 ราย และแตกต่างกัน 7 ราย ได้แก่เครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing แปลเป็น suspected Hb CS trait (CSA_2A) ขณะที่วิธีอ้างอิงได้ผลเป็น normal Hb typing (A_2A) จำนวน 6 ราย และอีก 1 ราย วิธีอ้างอิงแปลผลเป็น β-thal trait (A_2A, A_2 = 3.8%) แต่เครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ได้ผลเป็นผู้ป่วยอาจได้รับเลือด (A_2EA) ผลการศึกษาความแม่นยำโดยการตรวจวิเคราะห์ซ้ำทั้ง within-run และ between-run พบมีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่าร้อยละ 5* ***สรุป*** *เครื่องอัตโนมัติ Capillarys 2 Flex Piercing มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ในงานประจำเพื่อช่วยวินิจฉัยผู้มียีนแฝง ผู้ป่วยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ โดยมีข้อดีคือสามารถแยก HbA_2 และ Hb E ออกจากกันได้และตรวจพบฮีโมโกลบิลไม่เสถียรเช่น Hb CS ในปริมาณน้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ*

คำสำคัญ : ● *Capillarys 2 Flex Piercing* ● *Capillary electrophoresis* ● *High pressure liquid chromatography* ● *ธาลัสซีเมีย* ● *ฮีโมโกลบินผิดปกติ*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2562;29:121-30.

ได้รับต้นฉบับ 9 พฤศจิกายน 2561 แก้ไขบทความ 7 ธันวาคม 2561 รับลงตีพิมพ์ 28 กุมภาพันธ์ 2562

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสาว เชาวณี วังช่วย หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

Original Article

Method validation of the Capillarys 2 Flex Piercing hemoglobin analyzer to investigate thalassemia and hemoglobinopathies

Chaowanee Wangchauy and Chawadee Nopparattana

Hematology Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University

Abstract:

Objective: *The study aimed to evaluate the accuracy of hemoglobin analysis by the Capillarys 2 Flex Piercing using capillary electrophoresis (CE) method compared with the Variant II using high pressure liquid chromatography (HPLC) for reference method.* ***Material and Method:*** *A total of 344 routine EDTA blood samples were collected to diagnose thalassemia and hemoglobinopathies.* ***Results:*** *Regarding normal Hb typing, carrier, thalassemia and hemoglobinopathies as the percentage of HbA_2, Hb E and Hb F detected by Capillarys 2 Flex Piercing (CE) and the reference method (HPLC) did not significantly differ ($p > 0.05$), i.e., 337 samples agreed with the hemoglobin typing interpretation and 7 samples disagreed (6 of the Capillarys 2 Flex Piercing reported CSA_2A, a suspected Hb CS trait). However, Variant II reported A_2A and 1 of the Hb type = A_2EA from Capillarys 2 Flex Piercing but Variant II reported A_2A (A_2 = 3.8%) indicating the β-thal trait. Using the coefficient of variation the within-run and between-run precision was less than 5%* ***Conclusion:*** *The Capillarys 2 Flex Piercing is capable of identifying and quantifying hemoglobin species. The major advantage of the CE method is its ability to separate and quantitate HbA_2, Hb E which are important parameter required to diagnose β-thal trait. Alternatively a blood transfusion could successfully detect unstable Hb as Hb CS in the heterozygous state. This instrument proved useful in providing relevant data to investigate thalassemia and hemoglobinopathies.*

Keywords : ● *Capillarys 2 Flex Piercing* ● *Capillary electrophoresis* ● *High pressure liquid chromatography* ● *Thalassemia* ● *Hemoglobinopathy*

J Hematol Transfus Med. 2019;29:121-30.

บทนำ

โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) และภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติ (hemoglobinopathy) เป็นโรคโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive ซึ่งพบมีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทยและแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้[1] การตรวจวินิจฉัยพาหะและโรคธาลัสซีเมียทางห้องปฏิบัติการทำได้โดยตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติที่นิยมใช้มี 2 หลักการคือ 1) โครมาโตกราฟฟีอัดแรงดันซึ่งมีทั้งแบบแรงดันสูง (high pressure liquid chromatography; HPLC) และแบบแรงดันต่ำ (low pressure liquid chromatography; LPLC) ใช้หลักการแลกเปลี่ยนอิออนบวก โดยฮีโมโกลบินแต่ละชนิดมีความแรงในการยึดติดอยู่ในคอลัมน์แตกต่างกัน จึงถูกชะออกมาด้วยบัฟเฟอร์ที่เวลาต่างกัน (retention time; RT) ฮีโมโกลบินที่ถูกชะออกมาจะถูกส่งผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ประมวลผลเป็นโครมาโตรแกรม (chromatogram) โดยวิธี HPLC มีประสิทธิภาพในการแยกที่ดีกว่า LPLC จึงเป็นที่นิยมมากกว่า[2] 2) การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก (capillary electrophoresis; CE) ใช้หลักการแยกฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงผ่านหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก โดยฮีโมโกลบินแต่ละชนิดประจุสุทธิแตกต่างกันทำให้สามารถแยกชนิดของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ตามแรงขับเคลื่อนไฟฟ้า (electro osmotic flow; EOF) แล้วรายงานผลออกมาเป็นอิเลกโตรโฟรีแกรม (electrophoregram)[3] เครื่องวิเคราะห์ทั้งสองหลักการนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Hb A_2, Hb F และ Hb S ได้ใกล้เคียงกัน[4-6] นอกจากนี้เครื่อง CE ยังสามารถตรวจวิเคราะห์ Hb A2 ได้แม่นยำถึงแม้ตัวอย่างเลือดเก็บไว้นานถึง 16 วัน[7] และการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้า (migration time) ของ Hb S, Hb C, Hb E ได้ตรงโซนที่กำหนดไว้อย่างถูกต้อง[8,9] ด้วยศักยภาพการตรวจวิเคราะห์ของเครื่อง CE ที่สามารถแยก Hb A_2 และ Hb E ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และยังสามารถวัดปริมาณ Hb H และ Hb Bart's ได้ในขั้นตอนเดียวโดยไม่ต้องใช้ร่วมกับการแยกโดยวิธีอื่นๆ เพื่อรายงานผล จึงทำให้เครื่องที่อาศัยหลักการ CE นี้ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการรายงานผล (validation) ทำการเปรียบเทียบผล (comparison) และตรวจความแม่นยำ (precision) ของเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Capillarys 2 Flex Piercing ก่อนจะนำเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัตินี้มาทำการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำแทนที่เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Variant II ที่ใช้หลักการ HPLC ที่ใช้ก่อนหน้านี้[10,11] ทั้งนี้การศึกษาครั้งนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ก่อนดำเนินการ

วัสดุและวิธีการ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาภาคตัดขวางเพื่อสอบทวนความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing วิธี CE เปรียบเทียบกับเครื่องมือทดสอบมาตรฐานเดิมคือ เครื่อง Variant II ซึ่งใช้หลักการ HPLC ในช่วง 1 ถึง 30 เมษายน 2558

กลุ่มตัวอย่าง

เลือดจากหลอดเลือดดำบรรจุในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด K_2EDTA ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 343 รายและเลือดที่เจาะจากสายสะดือเด็กทารกในครรภ์ 1 รายที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ในช่วง 1-30 เมษายน 2558

วิธีการ

1. การตรวจวิเคราะห์ดัชนีเม็ดเลือดแดง (red blood cell indices) โดยนำตัวอย่างเลือดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องนับเซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ XT 1800i (Sysmex, Japan)[12] บันทึกค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ประกอบด้วย RBC, Hb, Hct, MCV, MCH และ MCHC

2. การศึกษาความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_2, และ Hb F ด้วยเครื่อง CE โดยใช้สารควบคุมคุณภาพ normal control และ ตัวอย่างเลือดที่มีค่า HbA_2, และ Hb F สูงมาทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งในลักษณะ within-run โดยนำมาตรวจวิเคราะห์ซ้ำ 20 ครั้งภายในวันเดียวกัน และ between-run โดยนำมาวิเคราะห์วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 22 วัน

3. การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Variant II (วิธี HPLC) และตามด้วยเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing (วิธี CE) ภายในวันเดียวกัน บันทึกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่เครื่องวิเคราะห์ออกมาได้ ประเมินความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงเดิม การแปลผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน โดยใช้เกณฑ์ตามคู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบิลผิดปกติ ฉบับปรับปรุง 2558[13]

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ใช้สถิติเชิงพรรณา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard devidation, SD) คำนวณค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง แยกตามกลุ่มธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ

2. วิเคราะห์ความแม่นยำโดยการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) จากการทดสอบสารควบคุมคุณภาพใช้เกณฑ์ผ่าน total CV < 0.33[14]

Table 1 Blood indices parameter of each Hb type at Songklanagarind Hospital (mean ± SD)

Subject	N	RBC ($X10^{12}$/L)	Hb (g/dL)	Hct. (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)
1. Normal or non clinically significant thalassemia (Hb A_2 ≤ 3.5%, MCV ≥ 80 fL)	39	4.5 ± 0.6	12.9 ± 1.8	38.3 ± 4.9	84.6 ± 4.4	28.5 ± 1.8	33.7 ± 1.2	13.3 ± 1.1
2. Normal Hb typing, not rule out α-thalassemia (Hb A_2 ≤ 3.5%, MCV < 80 fL)	96	4.8 ± 0.8	10.7 ± 2.2	33.3 ± 5.5	69.0 ± 7.6	22.1 ± 3.1	32.0 ± 1.9	16.6 ± 3.3
3. β-thal trait with or without α-thalassemia	35	5.2 ± 1.0	11.1 ± 2.3	33.7 ± 6.4	64.4 ± 5.8	21.2 ± 1.9	32.9 ± 1.5	17.0 ± 2.2
4. Hb E trait	39	4.7 ± 0.7	11.8 ± 1.5	35.1 ± 4.7	75.1 ± 4.8	25.3 ± 2.1	33.8 ± 1.3	15.0 ± 2.8
5. Hb E trait with or without α-thalassemia	34	4.7 ± 0.7	11.1 ± 2.0	33.2 ± 5.5	70.0 ± 5.5	23.5 ± 2.2	33.5 ± 1.4	15.9 ± 3.4
6. Homozygous Hb E	11	5.6 ± 0.5	10.8 ± 1.3	31.4 ± 3.0	56.1 ± 3.6	19.2 ± 1.0	34.5 ± 1.8	16.1 ± 2.2
7. Hb H disease	5	5.3 ± 1.1	9.2 ± 1.2	30.3 ± 5.4	58.2 ± 9.9	17.7 ± 1.5	30.4 ± 1.5	24.2 ± 5.9
8. β^0-thal/Hb E disease	2	4.9 ± 0.2	9.1 ± 0.1	27.2 ± 0.7	56.0 ± 3.8	18.6 ± 0.7	33.1 ± 0.8	29.2 ± 0.5
9. β^+-thal disease or HPFH	1	4.13	11.9	35.2	85.1	28.8	33.9	10.6
10. Normal Hb typing in newborn	60	4.1 ± 0.6	14.5 ± 2.0	41.8 ± 5.4	103.3 ± 9.5	36.0 ± 2.8	34.9 ± 1.3	17.2 ± 2.0
11. α-thal trait in newborn	4	3.4 ± 0.5	13.0 ± 1.4	39.6 ± 4.3	118.9 ± 4.8	38.9 ± 1.4	32.7 ± 0.9	18.7 ± 5.1
12. Hb E trait in newborn	4	4.6 ± 0.5	15.3 ± 1.0	43.0 ± 3.4	92.4 ± 9.4	3.8 ± 3.1	36.6 ± 0.8	15.7 ± 0.3
13. Suspected α-thal trait in children (2-6 month)	4	3.5 ± 0.6	9.6 ± 2.1	28.8 ± 5.5	80.1 ± 9.0	27.6 ± 3.6	34.5 ± 3.5	15.1 ± 2.3
14. Hb Bart's hydrop fetalis	1	2.76	6.5	25.2	90.3	23.3	25.8	ND
15. suspected Hb CS trait/Normal	6	4.8 ± 0.9	11.5 ± 2.0	35.8 ± 6.0	74.7 ± 6.2	24.1 ± 2.5	32.2 ± 1.7	15.6 ± 3.5
16. check blood transfusion/β-thal trait	1	2.28	6.3	20.1	88.2	27.6	31.3	18.4

ND : No data

3. หาค่าความสัมพันธ์ของปริมาณ HbA_2, Hb E และ Hb F ระหว่างเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing และเครื่อง Variant II ด้วยสถิติ Pearson's correlation

4. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณ HbA_2, Hb E และ Hb F ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing และเครื่อง Variant II ด้วยสถิติ paired t-test ทุกการทดสอบกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

1. ผลการวิเคราะห์ดัชนีเม็ดเลือดแดงแยกตามกลุ่มตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์ดัชนีเม็ดเลือดแดง โดยใช้ MCV เป็นตัวคัดกรอง α-thalassemia และ β-thalassemia พบว่าในกลุ่ม normal ที่มีผล Hb type=A_2A, $A_2 \leq 3.5\%$ จำนวน 135 รายจะสามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยตามค่า MCV คือ 1)หากมีค่า MCV ≥ 80 fL จัดเป็นกลุ่ม normal or non clinically significant thalassemia จำนวน 39 รายซึ่งมีค่าเฉลี่ยของ MCV ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 84.6 ± 4.4 fL 2)หากมีค่า MCV < 80 fL จัดเป็นกลุ่ม normal Hb typing, not rule out α-thalassemia จำนวน 96 ราย ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของ MCV ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 69.0 ± 7.6fL ในกลุ่ม β-thal trait ที่มีผล Hb type = A_2A, $A_2 > 3.5\%$ จำนวน 35 รายซึ่งมีค่าเฉลี่ยของ MCV ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 64.4 ± 5.8 fL และสำหรับค่าเฉลี่ยของ MCV ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในกลุ่มอื่นๆ อีก 13 กลุ่ม ได้แสดงไว้ใน Table 1

2. ผลการศึกษาความแม่นยำ

ผลการศึกษาความแม่นยำของเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ในการวิเคราะห์ปริมาณ HbA_2 และ Hb F โดยการวิเคราะห์ซ้ำทั้งในลักษณะ within-run และ between-run พบว่ามีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่าร้อยละ 5 ดัง Table 2

Table 2 Precision data for hemoglobin A_2 and Hb F on the Capillarys 2 Flex Piercing.

	Within-run		Between-run	
	mean (%)	CV (%)	mean (%)	CV (%)
Normal				
Hb A_2	2.59	2.66	2.6	2.66
Abnormal				
Hb A_2	4.14	1.21	4.13	1.27
Hb F	16.04	0.53	15.96	0.94

3. ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

การแปลผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินตัวอย่างเลือด 344 ราย โดยเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ซึ่งอาศัยหลักการ CE เปรียบเทียบกับเครื่อง Variant II อาศัยหลักการ HPLC ได้ผลตรงกัน 337 ราย แยกเป็นกลุ่มดังนี้: normal Hb typingnot rule out α-thalassemia 135 ราย, β-thal trait 35 ราย, Hb E trait 39 ราย, Hb E trait with or without α-thal trait 34 ราย, Hb E homozygote 11 ราย, Hb H disease 5 ราย, β^0-thal/Hb E disease 2 ราย, β^+-thal disease or HPFH 1 ราย, abnormal Hb 2 ราย, normal Hb typing ในเด็กแรกคลอด 60 ราย, α-thal trait ในเด็กแรกคลอด 4 ราย, Hb E trait ในเด็กแรกคลอด 4 ราย, normal Hb typing not rule out α-thalassemia ในเด็กเล็กอายุ 2-6 เดือน 4 รายและ Hb Bart's hydrop fetalis 1 รายดัง Table 3 และพบการแปลผลไม่ตรงกัน 7 ราย ได้แก่ เครื่องหลักการ Variant II แปลผลเป็น β-thal trait (A_2A, A_2 = 3.8%) แต่เครื่องหลักการ Capillarys 2 Flex Piercing ได้ผลเป็น A_2EA (A_2 = 2.2%, E = 1.4%) จำนวน 1 ราย ซึ่งเมื่อตรวจสอบข้อมูลกลับพบว่าผู้ป่วยได้รับเลือดภายใน 3 เดือนก่อนส่งตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินและเครื่อง Variant II ได้ผลเป็น A_2A แปลผลเป็น normal Hb typing ขณะที่เครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ได้ผลเป็น CSA_2A แปลผลเป็น suspected Hb CS trait จำนวน 6 รายดัง Table 4

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbA_2

ในกลุ่ม normal Hb typing not rule out α-thalassemia 135 ราย และกลุ่ม β-thal trait 35 ราย เครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing วิธี CE วิเคราะห์ปริมาณ HbA_2 มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 2.6 ± 0.37 และ 5.0 ± 1.03 ตามลำดับ เครื่อง Variant II วิธี HPLC วิเคราะห์ปริมาณ HbA_2 มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ ร้อยละ 2.7 ± 0.32 และ 5.1 ± 0.93 ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบ paired t-test พบว่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.005

ความสัมพันธ์ของปริมาณ HbA_2 ที่วิเคราะห์จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing และเครื่อง Variant II ในกลุ่มตัวอย่างรวม 170 ราย ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9683 เมื่อแยกเป็นกลุ่ม normal Hb typing not rule out α-thalassemia และ β-thal trait ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9582 และ 0.9297 ตามลำดับ

Table 3 The percentage of Hb A_2, Hb E, Hb F and other types of Hb and Hb typing interpretation from Capillarys 2 Flex Piercing (CE) compared with those from Variant II (HPLC)

No.	Hb type	Number of cases	Capillarys 2 Flex Piercing (CE)			Other Hb	Hb A2(%)	Variant II (HPLC)		Other Hb	Interpretation	Degree of agreement (%)
			Hb A2 (%)	Hb E (%)	Hb F (%)			Hb E (%)	Hb F (%)			
1	A_2A (A2 < 3.5%)	135	2.6 ± 0.37				2.7 ± 0.32				Normal Hb typing, not rule out α-thalassemia	100
2	A_2A, (A_2 > 3.5%)	35	5.0 ± 1.03				5.1 ± 0.93				β-thal trait with or without α-thalassemia	100
3	EA	39		29.3 ± 1.13*				27.21 ± 0.87*			Hb E trait	100
4	EA	34		24.8 ± 4.67*				22.9 ± 3.44*			Hb E trait with or without α-thalassemia	100
5	EE	11		91.3 ± 1.56*				80.0 ± 2.23*			Homozygous Hb E	100
6	A_2AH	5		0.98 ± 0.3		Hb H	1.5 ± 0.2			Hb H	Hb H disease	100
7	EF	2									β^0-thal/Hb E disease	100
8	A_2FA	1	2.3		26.8		2.4		22.9		β^+-thal disease or HPFH	100
9	A_2A+Abnormal Hb	2									Suspected abnormal Hb	100
10	A_2FA(FA)	60			80.97 ± 11.94				77.54 ± 12.83		Normal Hb typing in newborn	100
11	FA Bart's	4			85.4 ± 8.9	Hb Bart's			83.8 ± 10.9	Hb Bart's	α-thal trait in newborn	100
12	EFA	4	0.18 ± 0.2	5.45 ± 1.1	81.85 ± 3.8		6.52 ± 1.3		76.87 ± 6.2		Hb E trait in newborn	100
13	A_2FA	4	1.2 ± 0.9		38.2 ± 22.2		1.7 ± 0.9		35.1 ± 20.6		Suspected α-thal trait in children (2-6 month)	100
14	Bart's and embryonic Hb	1				Hb Bart's				Hb Bart's	Hb Bart's hydrop fetalis	100
15	CSA_2A/A_2A	6	2.3 ± 0.2			CS = 0.9 ± 0.4	2.51 ± 0.3				Suspected Hb CS trait/ Normal	0
16	A_2EA/A_2A	1	2.2	1.4	0.9		3.8		1.2		check blood transfusion/ β-thal trait	0

Table 4 Interpretation of Hemoglobin typing from Capillarys 2 Flex Piercing (CE) compared with those from Variant II (HPLC)

Number	Capillarys 2 Flex Piercing (CE)				Variant II (HPLC)		
	Hb type	Hb A_2 (%)	Other Hb (%)	Interpretation	Hb type	Hb A_2 (%)	Interpretation
1	CS A_2A	2.3	CS=0.6	Suspected Hb CS trait	A_2A	2.7	normal
2	CS A_2A	2.3	CS=0.6	Suspected Hb CS trait	A_2A	2.7	normal
3	CS A_2A	2.3	CS=0.9	Suspected Hb CS trait	A_2A	2.3	normal
4	CS A_2A	2.7	CS=1.1	Suspected Hb CS trait	A_2A	2.7	normal
5	CS A_2A	2.7	CS=1.5	Suspected Hb CS trait	A_2A	2.7	normal
6	CS A_2A	2.0	CS=0.7	Suspected Hb CS trait	A_2A	2.0	normal
7	A_2EA	2.2	E=1.4	Check blood transfusion	A_2A	3.8	β -thal trait

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Hb E

ในกลุ่ม Hb E trait 39 ราย, Hb E trait with or without α-thal trait 34 รายและ Hb E homozygote 11 รายเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing วิธี CE วิเคราะห์ปริมาณ Hb E มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เป็นร้อยละ 29.3 ± 1.13, 24.8 ± 4.67 และ 91.3 ± 1.56 ตามลำดับ เครื่อง Variant II วิธี HPLC วิเคราะห์ปริมาณ Hb E มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เป็นร้อยละ 27.2 ± 0.87, 22.9 ± 3.44 และ 80.0 ± 2.23 ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบ paired t-test พบว่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.005

ความสัมพันธ์ของปริมาณ Hb E ที่วิเคราะห์จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing และ เครื่อง Variant II ในกลุ่มตัวอย่าง 84 ราย ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9948 โดยแยกเป็นในกลุ่ม Hb E trait, Hb E trait with or without α-thal trait และ Hb E homozygote ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9373, 0.9426 และ 0.8950 ตามลำดับ

การตรวจวิเคราะะห์ปริมาณ Hb F

ในเด็กแรกคลอด (อายุน้อยกว่า 1 เดือน) ที่มีผล normal Hb typing 60 ราย, Hb E trait 4 ราย และ α-thal trait 4 ราย เครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing วิธี CE วิเคราะห์ปริมาณ Hb F มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 80.97 ± 11.94, 81.85 ± 3.8 และ 81.9 ± 3.8 ตามลำดับ เครื่อง Variant II วิธี HPLC วิเคราะห์ปริมาณ Hb F มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ ร้อยละ 77.54 ± 12.83, 83.8 ± 10.9 และ 76.87 ± 6.2 ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบ paired t-test พบว่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.005

ความสัมพันธ์ของปริมาณ Hb F ที่วิเคราะห์จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing และเครื่อง Variant II ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9064

วิจารณ์

จากผลการศึกษาในกลุ่มที่มีการแปลผลตรงกันทั้งสองวิธี จำนวน 337 ราย โดยแบ่งเป็น 14 กลุ่ม (Table 3) พบว่า เครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing (วิธี CE) สามารถวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินได้อย่างถูกต้อง เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่อง Variant II (วิธี HPLC) ซึ่งใช้เป็นวิธีอ้างอิง โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณ HbA_2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งกลุ่ม normal Hb typing not rule out α-thalassemia และกลุ่ม β-thal trait (Figure 1) เครื่อง CE รายงานช่วงค่าปริมาณร้อยละ HbA_2 ในกลุ่ม normal Hb typing not rule out α-thalassemia เท่ากับ 1.86 ถึง 3.34 และในกลุ่ม β-thal trait เท่ากับ 3.8 ถึง 6.2 แสดงให้เห็นว่า การทดสอบด้วยเครื่อง CE สามารถวินิจฉัยพาหะของ β-thal trait โดยใช้เกณฑ์ร้อยละ HbA_2 มากกว่า 3.5[10] ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับปริมาณ Hb E (Figure 2) ในกลุ่ม Hb E trait, Hb E trait with or without α-thal trait และ Hb E homozygote ผลการวิเคราะห์ปริมาณ HbE รวมกับปริมาณ HbA_2 จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing เปรียบเทียบกับผลปริมาณ HbE จากเครื่อง Variant II พบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ยกเว้นกลุ่ม Hb E homozygote ($p < 0.05$) แต่ไม่ทำให้มีผลต่อการแปลผลเปลี่ยนแปลงเนื่องจากปริมาณ HbE ทั้งสองวิธีให้การแปลผลเป็น Hb E homozygote เช่นเดียวกัน โดยการกระจายตัวของปริมาณ HbE รวมกับปริมาณ HbA_2 จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ในกลุ่ม Hb E trait, Hb E trait with or without α-thal trait และ Hb E homozygote มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ ร้อยละ 29.2 ± 1.13, 24.8 ± 4.67 และ 91.3 ± 1.56 ตามลำดับ (Table 1) จึงสามารถใช้ค่าอ้างอิงเดียวกับวิธีมาตรฐานได้ซึ่งในการแปลผลนั้นทำโดยการนำค่าปริมาณ HbE รวมกับปริมาณ HbA_2 ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ HbE โดยเครื่อง Capillarys 2

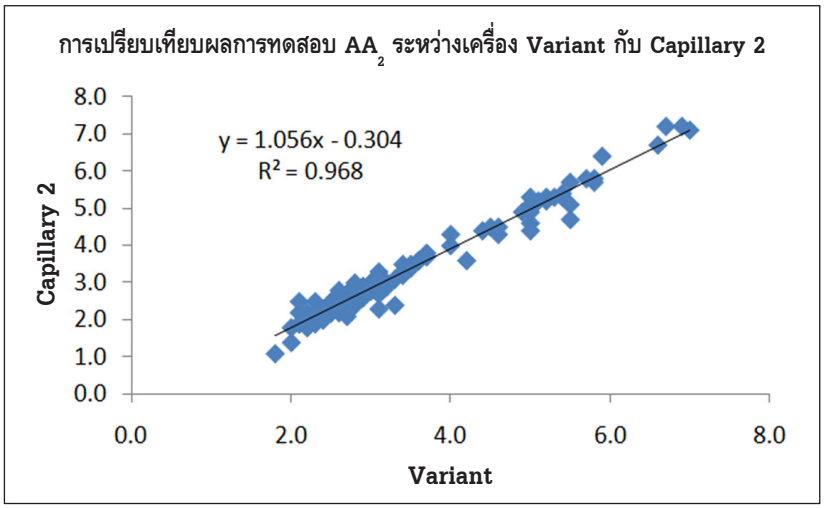

Figure 1 Relationship of the percentage of Hb A_2 obtained from Capillarys 2 Flex Piercing compared with Variant II in normal Hb typing and β-thal trait.

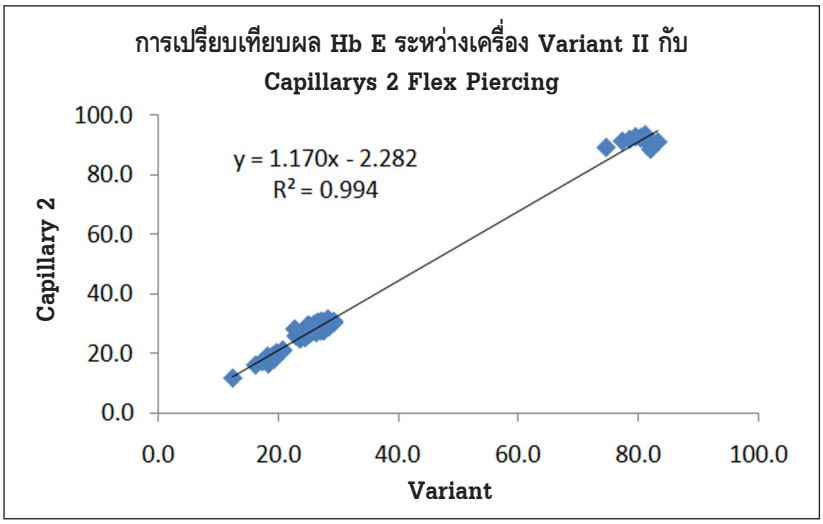

Figure 2 Relationship of the percentage of Hb E plus Hb A_2 obtained from Capillarys 2 Flex Piercing compared with those from Variant II in Hb E trait and homozygous Hb E.

Flex Piercing สามารถแยก Hb E trait, Hb E trait with or without α-thal trait และ Hb E homozygote ออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับปริมาณ HbF ในกลุ่ม normal Hb typing not rule out α-thalassemia จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing และเครื่อง Variant II แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ตรวจพบปริมาณ Hb F น้อยกว่าเครื่อง Variant II เล็กน้อยและบางรายไม่สามารถตรวจวัดได้ซึ่งปริมาณ Hb F ที่ตรวจวัดได้ไม่มีผลต่อการแปลผลเนื่องจากผลที่ได้มีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 1 และให้การแปลผลเป็น normal Hb typing not rule out α-thalassemia เช่นเดียวกัน สำหรับกลุ่ม β-thal trait พบว่าปริมาณ Hb F สอดคล้องกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) การกระจายตัวของปริมาณ Hb F จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ในกลุ่ม normal Hb typing 135 รายและ β-thal trait 35 รายอยู่ในช่วง 0.18 ± 0.38% และ 1.52 ± 1.39% ตามลำดับ สำหรับปริมาณ Hb F ในกลุ่มเด็กแรกคลอดอายุน้อยกว่า 1 เดือน (Figure 3) ปริมาณ Hb F ทั้งสองวิธีสอดคล้องกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) การกระจายตัวของปริมาณ Hb F จากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ในกลุ่มเด็กแรกคลอดอายุน้อยกว่า 1 เดือน อยู่ในช่วง 81.51 ± 11.60%

สำหรับในกลุ่มที่การแปลผลไม่ตรงกัน 7 ราย (Table 3) เครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ได้ผลการวิเคราะห์เป็น A_2EA (A_2 = 2.2%, E = 1.4%) ซึ่งแปลผลเป็นผู้ป่วยอาจได้รับเลือด ขณะที่เครื่อง Variant II ได้ผลเป็น A_2A (A_2 = 3.8%) ซึ่งแปลผลเป็น β-thal trait โดยเมื่อตรวจสอบข้อมูลผู้ป่วยพบว่าผู้ป่วยรายนี้ได้รับ

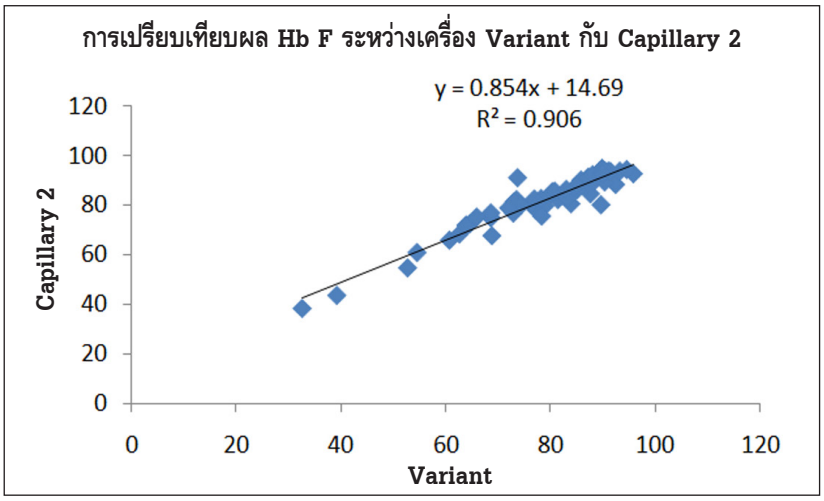

Figure 3 Relationship of the percentage of Hb F obtained from Capillarys 2 Flex Piercing compared with Variant II in the newborns.

การให้เลือดภายใน 3 เดือนก่อนที่จะส่งตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน เนื่องจากเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing อาศัยหลักการ CE ซึ่งสามารถแยก Hb A_2 และ HbE ออกจากกันได้ นับเป็นข้อดีของเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ในส่วนที่การแปลผลต่างกันอีกจำนวน 6 รายนั้น เครื่อง Variant II ได้ผลการวิเคราะห์เป็น A_2A โดยมีปริมาณ Hb A_2 มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 2.51 ± 0.2 แปลผลเป็น normal Hb typing ขณะที่เครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ได้ผลการวิเคราะห์เป็น CSA_2A ซึ่งจะพบ peak Hb CS อยู่ในโซนที่ 2 โดยมีปริมาณ Hb A_2 และ Hb CS มีค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 2.3 ± 0.2% และ 0.9 ± 0.4% ตามลำดับ โดยผู้เชี่ยวชาญผลิตภัณฑ์ของบริษัทได้แนะนำว่าสามารถรายงานผลการทดสอบเป็น Hb CS ได้โดยแปลผลเป็น suspected Hb CS trait อย่างไรก็ตาม Hb CS ที่ตรวจได้ยังไม่ได้รับการตรวจยืนยันโดยวิธีมาตรฐาน และยังไม่มีค่าอ้างอิงที่ชัดเจนเช่นเดียวกับการศึกษาของ Waneesorn และคณะ[15] และการศึกษาของ Pornprasert และคณะ[16] ซึ่งคณะผู้วิจัยเห็นว่าควรได้ทำการศึกษาอย่างละเอียดตามระเบียบวิธีวิจัยเพื่อสามารถสรุปผลให้ชัดเจนและสามารถนำมาใช้อ้างอิงในงานประจำได้ในโอกาสต่อไป

สรุป

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน โดยเครื่อง Capillarys 2 Flex Piercing ซึ่งอาศัยหลักการ CE สามารถรายงานชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินได้อย่างถูกต้อง ช่วยในการวินิจฉัยผู้มียีนแฝง ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติได้เทียบเท่าเครื่อง Variant II ซึ่งอาศัยหลักการ HPLC และยังมีข้อดีในการตรวจแยก Hb A_2 และ Hb E ออกจากกันได้และสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินไม่เสถียรเช่น Hb CS ในปริมาณน้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับความแม่นยำสรุปได้จากผลการวิเคราะห์ซ้ำทั้งในลักษณะ within-run และ between-run ของปริมาณ Hb A_2 และ Hb F ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่าร้อยละ 5

เอกสารอ้างอิง

1. *Viprakasit V. Comprehensive Management of Thalassemia. J Hematol Transfus Med. 2013;23:303-20.*
2. *Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of haemogloy binopathies and thalassemia: review and update. Clin Chem. 2000;46:1284-90.*
3. *Winichagoon P, Svasti S, Munkongdee T, Chaiya W, Boonmongkol P, Chantrakul N, et al. Rapid diagnosis of thalassemiaa and other hemoglobonopathies by capillary electrophoresis system. Transl Res. 2008;152:178-84.*
4. *Wangrungrot P, Changsri K. Deviation of abnormalhemoglobin diagnosis using hemoglobin typing technic. J Hematol Transfus Med. 2014;24:151-6.*
5. *Agouti I, Merono F, Bonello-Palot N, Badens C. Analytical evaluation of the Capillarys 2 Flex piercing for routine haemoglobinopathies diagnosis. Int J Lab Hematol. 2013;35:217-21.*
6. *Sangkitporn S, Sangkitporn SK, Tanjatham S, SuwannakanB, Rithapirom S, Yodtup C, et al. Multicenter validation of fully automated capillary electrophoresis method for diagnosis of thalassemias and haemoglobinopathies in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2011;42:1224-32.*
7. *Borbely N, Phelan L, Szydlo R, Bain B. Capillary zone electrophoresis for haemoglobinopathy diagnosis. J Clin Pathol. 2013;66:29-39.*
8. *Altinier S, Varagnolo M, Zaninotto M, Plebani M. Identification and quantification of hemoglobins in whole blood: the analytical and organizational aspects of Capillarys 2 Flex Piercing compared with agarose electrophoresis and HPLC methods. Clin Chem Lab Med. 2012;12:1-7.*

9. *Higgins TN, Khajuria A, Mack M. Quantification of Hb A_2 in patients with and without β- thalassemia and in the presence of Hb S, Hb C, Hb E, and Hb D Punjab hemoglobin variants. Am J Clin Pathol. 2009;131:357-62.*
10. *Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillarys Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. Clin Chim Acta. 2012;16:1232-8.*
11. *Boonkant P, Sangkitporn S, Yodtup C, Masasso S, Sangkitporn S. Validation of automated hemoglobin analyzer: Capillarys 2 Flex Piercing for diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies. J Med Assoc Thai. 2013;41:4457-71.*
12. *Sysmex Corporation. Automated hematology analyzer XT-2000i/ XT1800i instructions for use. Kobe: The Corporation; 2010.*
13. *Lab manual of thalassemia and hemoglobinopathies investigation. Revised edition. Clinical Research Center Department of Medical Sciences. Ministry of Public Health. 2015.*
14. *Westgard JO, Carey RN, Wold S. Criteria for judging precision and accuracy in methog development and evaluation. Clin Chem. 1974;20: 825-33.*
15. *Waneesorn J, Panyasai S,Kongthai K, SingboottraP, Pornprasert S. Comparison between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for detection and quantification of Hb Constant Spring. Hemoglobin. 2011;35:338-45.*
16. *Pornprasert S, Panyasai S, Waneesorn J, Kongthai K, Singboottra P. Quantification of hemoglobin Constant Spring in heterozygote and homozygote by a capillary electrophoresis method. Int J Lab Hematol. 2012;34:143-7.*