

## นิพนธ์ต้นฉบับ

# A2 TEST : วิธีวัดสัดส่วนของปริมาณ Hb A<sub>2</sub> อย่างง่าย เพื่อใช้ในการค้นหา $\beta^0$ -thalassemia trait

ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, ประนุช ต้นไพบูลย์, แสงเดือน วงษ์เมตตา\*, สุรสิทธิ์ ชมชื่น  
และ ศศินิยา จำรัสรัตนกร

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, \*ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพ เขต 10 จังหวัดเชียงใหม่

**ความเป็นมา:** Hb A<sub>2</sub> พบในคนปกติราว 3% สัดส่วนดังกล่าวจะสูงขึ้นในผู้ที่เป็น  $\beta$ -thalassemia trait และจะสูงขึ้นมากใน  $\beta^0$ -thalassemia trait แต่ในประเทศไทย  $\beta$ -globin gene mutation ซึ่งเป็นสาเหตุของ  $\beta$ -thalassemia trait มีมากกว่า 30 ชนิด และมีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่จำเป็นต้องทราบสัดส่วนที่แน่นอนตลอดจนต้องมีวิธีการวัดค่าของ Hb A<sub>2</sub> ที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถให้บริการในการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงได้ **วิธีการ A2 test** เป็นวิธีที่พัฒนามาจากวิธี microcolumn DEAE sephadex A50 chromatography แต่ใช้ disposable syringe ขนาด 3.5 มล. เป็น column และ syringe disposable ขนาด 10 มล. เป็น reservoir ได้นำวิธี A2 test ไปตรวจหาค่า CV และค่า correlation coefficient เทียบกับวิธี automated HPLC และ automated LPLC และนำไปศึกษาตัวอย่างเลือดชนิดต่างๆ เพื่อหาค่า Hb A<sub>2</sub> ในคนปกติ และผู้ที่เป็น  $\beta^0$ -thalassemia trait **ผลการศึกษา** ค่า CV ของ วิธี A2 test อยู่ที่ระดับ 7.9% ขณะที่ของ automated HPLC และ LPLC เท่ากับ 1.8 และ 2.4% ตามลำดับ ค่า correlation coefficient ของ วิธี A2 test กับวิธี automated HPLC เมื่อนำไปวัดหาค่า Hb A<sub>2</sub> จากจำนวนหญิงฝากครรภ์ 300 ราย (r) เท่ากับ 0.99 และ A2 test เทียบกับวิธี automated LPLC เมื่อนำไปวัดค่า Hb A<sub>2</sub> ในอาสาสมัคร 149 ราย ให้ค่า r= 0.99 A2 test กับค่า Hb A<sub>2</sub> ใน  $\beta^0$ -thalassemia trait 74 ราย ให้ค่า Hb A<sub>2</sub> เฉลี่ยเท่ากับ  $6.08 \pm 0.76\%$  มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 4.3% และสูงสุดเท่ากับ 7.5% A2 test กับเลือดตัวอย่าง 449 ราย แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ใช่  $\beta$ -thalassemia trait มี 385 ราย มีค่า Hb A<sub>2</sub> เฉลี่ยเท่ากับ  $2.9 \pm 0.4\%$  โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-3.7% กลุ่มที่ 2 เป็น  $\beta$ -thalassemia trait มี 22 ราย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $5.4 \pm 0.6\%$  มีค่าอยู่ระหว่าง 4.5-6.7% และกลุ่มที่ 3 มีค่า Hb A<sub>2</sub> มาก 10% ขึ้นไป มี 39 รายเป็นพวก Hb E ผลการตรวจกรองของหญิงฝากครรภ์ 6,648 ราย โดยใช้ค่า Hb A<sub>2</sub> ระหว่าง 4.1-8% พบคู่เสี่ยง 21 คู่ และผลการวินิจฉัยก่อนคลอดจากคู่เสี่ยงพบฟีตัส 5 ราย เป็น homozygous  $\beta^0$ -thalassemia และ บิดามารดาของฟีตัสทั้ง 5 รายมีค่า Hb A<sub>2</sub> อยู่ระหว่าง 5.2-7.3% **วิจารณ์และสรุป** วิธี A2 test เป็นวิธีวัดหาค่า Hb A<sub>2</sub> อย่างง่าย มีค่า CV ต่ำ การตรวจวัดค่า Hb A<sub>2</sub> มีผลไปในทิศทางเดียวกับวิธี automated HPLC และ LPLC วิธี A2 test เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป การวิเคราะห์แต่ละรายราคาถูก ใน  $\beta^0$ -thalassemia trait Hb A<sub>2</sub> มีค่าอยู่ระหว่าง 4.3-8% ดังนั้น วิธี A2 test น่าจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในโครงการควบคุมและการป้องกันการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงสำหรับประเทศได้

**Key Words :** ● Hb A<sub>2</sub> ● Screening method ●  $\beta^0$ -thalassemia trait

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2543;10:17-28.

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 2 ธันวาคม 2542 และให้ตีพิมพ์ 30 ธันวาคม 2542

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ศ.นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

ประเทศไทยมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องจัดการให้บริการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม เพื่อควบคุมและป้องกันการเกิดโรค homozygous  $\beta$ -thalassemia มิฉะนั้นงบประมาณของกระทรวงสาธารณสุขจำนวนมาก อาจถูกนำไปใช้เพื่อการรักษาโรคดังกล่าวทั้งนี้ เป็นเพราะในแต่ละปีมีเด็กเกิดเป็นโรค homozygous  $\beta$ -thalassemia ถึง 600 ราย อีก 10 ปี ข้างหน้าจะมีผู้ป่วยถึง 6,000 ราย แต่ละรายมีค่าใช้จ่ายโดยตรงประกอบด้วย การให้ blood transfusion ชุดกรองและชุดให้เลือด ยาขับเหล็ก (desferrioxamine) และยาอื่นๆ ปีหนึ่งๆ มีค่าใช้จ่ายไม่น้อยกว่าหนึ่งแสนบาท และต้องให้การรักษาอย่างต่อเนื่อง<sup>1</sup> ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาเร่งด่วนต่อ health economics ของประเทศที่สำคัญ

ในการให้บริการทางพันธุศาสตร์ ของโรค homozygous  $\beta$ -thalassemia มีความจำเป็นที่จะต้องตรวจกรองหาผู้ที่ เป็นพาหะของโรคซึ่งสามารถทำได้โดยการวัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> เครื่องมือที่สามารถวัดปริมาณ Hb A<sub>2</sub> ได้ถูกต้องและแม่นยำมีหลายชนิด ได้แก่ automated high performance liquid chromatography<sup>2</sup> (Variant Hemoglobin Testing System, Bio-Rad-HPLC) low pressure liquid chromatography<sup>3</sup> capillary electrophoresis<sup>4,5</sup> และ capillary isoelectric focusing<sup>6,7</sup> แต่เครื่องมือเหล่านี้และการตรวจวิเคราะห์ แต่ละรายยังมีราคาแพงอยู่มาก

จึงขอรายงานวิธีการตรวจวัดปริมาณ Hb A<sub>2</sub> อย่างง่าย ซึ่งเตรียมได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และสามารถกำหนดค่าสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจกรองหาความเสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous  $\beta$ -thalassemia ชนิดร้ายแรงได้

### วัสดุและวิธีการ

#### วิธีการตรวจ Hb A<sub>2</sub> อย่างง่าย (A2 test)

Column A2 เตรียมมาจาก disposable syringe ขนาด 3.5 มล. บรรจุด้วย DEAE Sephadex A50

ขนาดความสูง 3 มล. DEAE Sephadex A50 ที่ใช้ในการบรรจุ column ได้ equilibrate มาแล้วอย่างดีด้วย 0.05 M TRIS-HCl-0.01% KCN buffer pH 8.5 (buffer pH 8.5) และต่อกับ column reservoir ซึ่งเป็น disposable syringe ขนาด 10 มล. (รูปที่ 1)

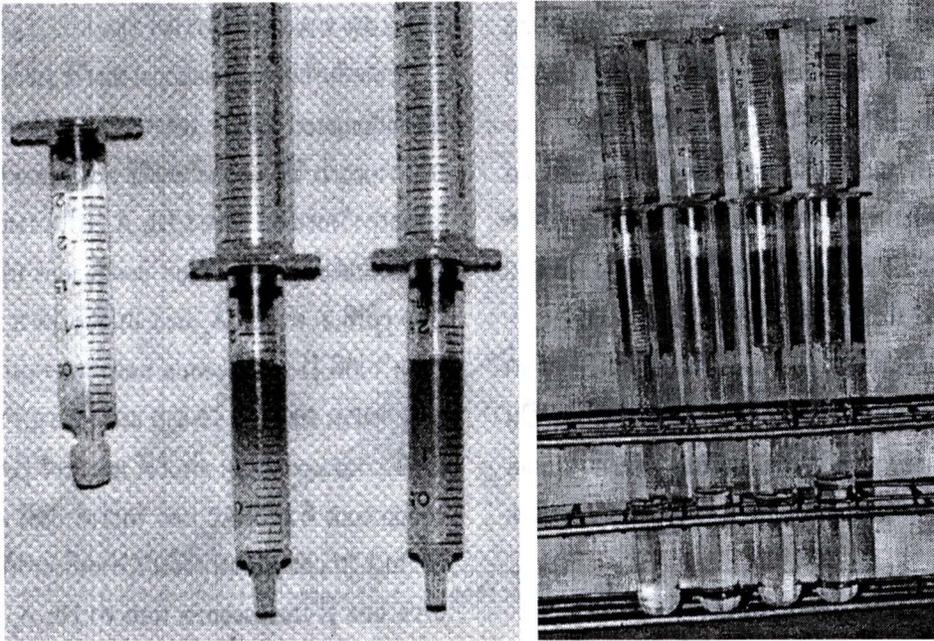
Hemolysate เตรียมได้โดยนำเลือด packed red blood cell (เหวี่ยงแยก plasma ที่ 3,000 รอบ/นาที) 30 ไมโครลิตร ละลายใน 2 มล. ของ buffer pH 8.5 นำไปวัดหาค่าความเข้มข้นโดยทำ dilution titer 1:100 และนำไปอ่าน absorbance ที่ช่วงคลื่น 415 nm hemolysate ที่ได้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 100 OD1/mL

หาลัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> เติม buffer pH 8.5 ลงใน column reservoir 10 มล. ปล่อยให้ buffer pH 8.5 ไหลผ่าน column จนเหลือ 5 มล. เติม hemolysate ที่เตรียมไว้ก่อนแล้ว จำนวน 1 มล. ลงไปคนให้เข้ากับ buffer ที่เหลือ ปล่อยให้ hemolysate ไหลลงใน column จนแห้ง ชะ (elute) Hb A<sub>2</sub> จาก column โดยใส่ buffer pH 8.2 (0.05 M TRIS-HCl-0.01% KCN buffer pH 8.2) ครั้งละ 10 มล. 2 ครั้ง แยกเก็บแต่ละ fraction นำ fraction ของ Hb A<sub>2</sub> ที่ elute ครั้งที่ 2 ไปอ่าน absorbance ที่ 415 nm เป็น OD2 ค่าสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> สามารถคำนวณได้คือ % Hb A<sub>2</sub> = 20 OD 2 ÷ OD1

วิธีวิเคราะห์ Hb A<sub>2</sub> ด้วย automated HPLC ทำได้โดยละลายเลือด (packed red cell) 5 ไมโครลิตร ใน hemolysis buffer 1 มล. ก่อนนำไป apply เข้าเครื่อง HPLC การวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างใช้  $\beta$ -thalassemia short program เป็นเวลาประมาณ 6 นาที<sup>2</sup>

วิธีวิเคราะห์หาลัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ด้วย automated LPLC ทำได้โดยละลายเลือด (whole blood) 10 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่น 1 มล. แล้วนำไป apply ลงในเครื่อง automated LPLC<sup>8</sup> (DREW LPLC)

Two minute osmotic fragility test (2 min OF) นำยาประกอบด้วย 0.45% glycerine phosphate



**ภาพที่ 1** เป็นภาพของ A2 test column บรรจุด้วย DEAE Sephadex A50 จำนวน 3 มล. ใน disposable syringe ขนาด 3.5 มล. และมี disposable syringe ขนาด 10 มล. ทำหน้าที่เป็น reservoir

buffer saline วิธีวัด pipet packed red cell 10 ไมโครลิตร ใส่ใน 10 มล. ของ buffer ปิดปากหลอดแก้วด้วยแผ่น parafilm คว่ำและหงายหลอดน้ำยา 2-3 ครั้ง เพื่อให้เลือดและ buffer ผสมกันดี โดยไม่เกิน 15 วินาที แล้วนำไปอ่าน OD ที่ absorbance 620 nm แบบ kinetics ณ เวลาที่ 15 วินาที และที่ 135 วินาที<sup>9,10</sup>

$$\% \text{ Hemolysis} = \frac{\text{OD 15 วินาที} - \text{OD 135 วินาที}}{\text{OD 15 วินาที}}$$

### วิธีศึกษา

ทดสอบความแม่นยำของวิธี A2 test เทียบกับวิธี automated HPLC และ วิธี automated LPLC นำเลือดตัวอย่างคนปกติและ  $\beta$ -thalassemia triat ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี A2 test วิธี automated HPLC และ วิธี automated LPLC ในวันที่เจาะเลือดมา (D-0) วิเคราะห์วันที่ 3 (D-3) วันที่ 7 (D-7) และวันที่ 14 (D-14) แต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 10 ครั้ง แล้วนำไปหาค่า mean ค่า standard deviation (SD) และหาค่า coefficient of variation (CV)

เปรียบเทียบความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างวิธี A2 test กับวิธี automated HPLC โดยนำเลือดของหญิงฝากครรภ์ 300 ราย มาหาค่า Hb A<sub>2</sub> ทุกรายด้วยวิธี A2 test และวิธี automated HPLC

เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง วิธี A2 test และวิธี automated LPLC จากตัวอย่างเลือดอาสาสมัคร 149 ราย

ศึกษาค่าสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ด้วยวิธี A2 test และวิธี automated HPLC จากตัวอย่างเลือดบิดามารดาของผู้ป่วย homozygous  $\beta^0$ -thalassemia เลือดตัวอย่างที่นำมาทดสอบการวัดปริมาณสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> เป็นเลือดที่มี EDTA เป็นสารห้ามการแข็งตัวของเลือด ได้จากบิดามารดาของผู้ป่วย homozygous  $\beta^0$ -thalassemia ชนิด blood transfusion dependent ซึ่งมาขอรับการรักษายู่กับหน่วยโลหิตวิทยาภาควิชากุมาร ผู้ป่วยเหล่านี้เคยได้รับการตรวจ DNA mutation มาแล้ว และเป็นชนิด homozygous 4 base pairs deletion ของ codon 41/42 (-CTTT) homozygous non-

sense mutation codon 17 (A-T) และ compound heterozygous 4 bp deletion codon 41/42 (-CTTT) กับ nonsense 17 (A-T)<sup>11</sup> จำนวน 74 ราย

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $\beta$ -thalassemia trait และวิธีการตรวจกรองด้วย 2 min OF จากเลือดตัวอย่าง 271 ราย โดยตรวจวัดหาสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ด้วยวิธี A2 test พร้อมกับวัดหาค่า 2 min OF

ศึกษาและทดสอบค่า Hb A<sub>2</sub> ที่เหมาะสมในการหา คู่เสี่ยงของหญิงผางครรภ์ 6,648 ราย ที่อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous  $\beta$ -thalassemia โดยวิธี 2 min OF และ A2 test เพื่อส่งต่อให้ทำการวินิจฉัยก่อนคลอด

### ผลการศึกษา

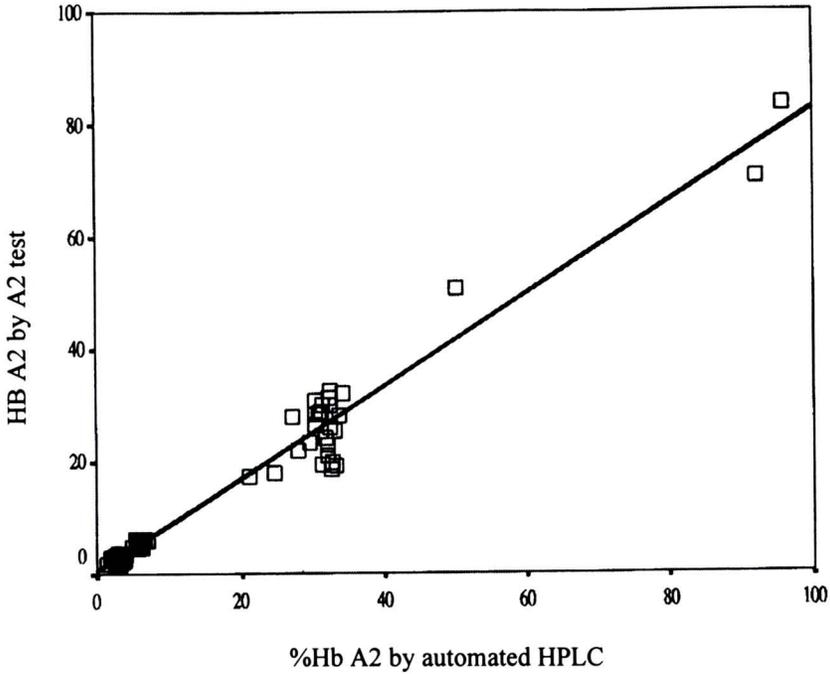
ความแม่นยำของวิธี A2 test โดยการทำซ้ำหลายครั้ง (10 ครั้ง) ในวันเดียวกันและต่างวันกัน พบว่าให้ค่า Hb A<sub>2</sub> ไม่ต่างกันมากและไม่ต่างจาก automated HPLC และ automated LPLC CV ของวิธี A2 test มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.9% ขณะที่ CV ของ automated HPLC และ automated LPLC มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.8

และ 2.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ค่าสหสัมพันธ์ (correlations) ของวิธี A2 test และวิธี automated HPLC โดยการตรวจหญิงผางครรภ์ 300 รายพบว่า วิธี A2 test และวิธี automated HPLC ให้ผลการวัดหาสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ไปในทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99 (รูปที่ 2) ค่า Hb A<sub>2</sub> test แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มค่าปกติ  $\beta$ -thalassemia trait และ กลุ่ม Hb E trait จำนวน 255 ราย, 16 ราย และ 29 รายตามลำดับ เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่ม ค่าปกติ และกลุ่ม  $\beta$ -thalassemia trait ด้วยวิธี A2 test พบว่าค่าปกติ ค่าต่ำสุดเท่ากับ 1.70 และสูงสุดเท่ากับ 3.7 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $2.9 \pm 0.4\%$  และ  $\beta$ -thalassemia trait ค่า Hb A<sub>2</sub> เท่ากับ 4.5-6.3% โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $5.4 \pm 0.6\%$  สำหรับวิธี automated HPLC ค่าปกติ ใน 255 ราย มีค่า Hb A<sub>2</sub> อยู่ระหว่าง 1.5-4.0% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $2.9 \pm 0.3\%$  และ  $\beta$ -thalassemia trait HPLC มีค่า Hb A<sub>2</sub> เท่ากับ 4.9-7.1% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $5.9 \pm 0.5\%$  (ตารางที่ 2) ทั้งค่าปกติ และ  $\beta$ -thalassemia trait ทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันทาง

**ตารางที่ 1** การศึกษา coefficient of variation (CV) เปรียบเทียบในการตรวจวัด Hb A<sub>2</sub> ด้วยวิธี A2 test กับวิธี automated HPLC และ automated LPLC

Day tested	Percentage of Hb A <sub>2</sub>						
	N	A2 Test	CV	HPLC	CV	LPLC	CV
Subject - Normal							
D - 0	10	2.96±0.28	9.4	2.62±0.04	1.5	1.61±0.05	3.1
D - 3	10	2.97±0.33	11.1	2.71±0.03	1.1	1.87±0.05	2.6
D - 7	10	2.55±0.21	8.2	2.52±0.10	4.0	1.49±0.06	4.0
D - 14	10	2.81±0.39	13.8	2.56±0.08	3.1	1.79±0.06	3.3
$\beta$ -thalassemia trait							
D - 0	10	5.82±0.28	4.8	6.15±0.05	0.8	5.50±0.08	1.4
D - 3	10	5.46±0.40	7.6	6.26±0.07	1.1	5.17±0.09	1.7
D - 7	10	5.17±0.22	4.2	6.49±0.07	1.0	5.76±0.08	1.4
D - 14	10	5.48±0.25	4.5	5.89±0.12	2.0	5.72±0.08	1.4



ภาพที่ 2 เป็นภาพแสดงสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างวิธี A2 test กับ วิธี automated HPLC ในการวัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ในหญิงฝากครรภ์ 300 ราย โดยมีค่า correlation coefficient (r) = 0.99

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์สัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ของหญิงฝากครรภ์ด้วยวิธี A2 test และวิธี automated HPLC

Subject	Method	N	Hb A <sub>2</sub> in %			p
			Minimum	Maximum	Mean±SD	
Normal	A2 test	255	1.7	3.7	2.9±0.4	> 0.001
	HPLC	255	1.5	4.0	2.9±0.3	
β-thal trait	A2 test	16	4.5	6.3	5.4±0.6	> 0.001
	HPLC	16	4.9	7.1	5.9±0.5	

สถิติ (p>0.001) กลุ่มที่ 3 Hb E carriers มี 29 ราย มีค่า Hb A<sub>2</sub> มากกว่า 10% ขึ้นไป

ผลของ correlation ของวิธี A2 test และ วิธี automated LPLC ในการวัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ในอาสาสมัคร 149 ราย พบว่าค่า Hb A<sub>2</sub> ที่วัดได้ไปในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน โดยมีค่า correlation coefficient (r) = 0.99 สัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ในกลุ่ม

อาสาสมัคร 149 ราย เมื่อพิจารณา เฉพาะกลุ่ม ค่าปกติ และกลุ่ม β-thalassemia trait พบกลุ่มปกติจำนวน 130 ราย โดยวิธี A2 test มีค่าระหว่าง 1.7-3.5% และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.8±0.5% โดยวิธี automated LPLC ของคนปกติมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-3.4% และมีเฉลี่ยเท่ากับ 2.3±0.3% สำหรับ β-thalassemia trait พบ 6 ราย โดยวิธี A2 test มีค่าอยู่ระหว่าง 4.7-6.7% ค่าเฉลี่ย

เท่ากับ  $5.5 \pm 0.9\%$  ใกล้เคียงกับค่า Hb A<sub>2</sub> ที่วัดได้ด้วยวิธี automated LPLC โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 4.2 - 7.0% และค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $5.3 \pm 1.0\%$  อาสาสมัครที่เหลือเป็น Hb E trait 13 รายมีค่า Hb A<sub>2</sub> มากกว่า 10% ทั้งสิ้น (ตารางที่ 3)

ค่า Hb A<sub>2</sub> ใน  $\beta$ -thalassemia trait ชนิดร้ายแรงจากเลือด  $\beta$ -thalassemia trait ซึ่งเป็นบิดาและมารดาของผู้ป่วย homozygous  $\beta^0$ -thalassemia ชนิด blood transfusion dependent 74 ราย พบค่า Hb A<sub>2</sub> โดยวิธี A2 test เท่ากับ  $6.08 \pm 0.76\%$  และโดยวิธี automated HPLC เท่ากับ  $6.03 \pm 0.51\%$  และไม่

ต่างกัน (ตารางที่ 4) ค่าต่ำสุดที่พบโดยวิธี A2 test เท่ากับ 4.3% และค่าสูงสุดเท่ากับ 7.5% ขณะที่ตรวจโดยวิธี automated HPLC พบค่าต่ำสุด 5.1% และค่าสูงสุดที่ 7.7%

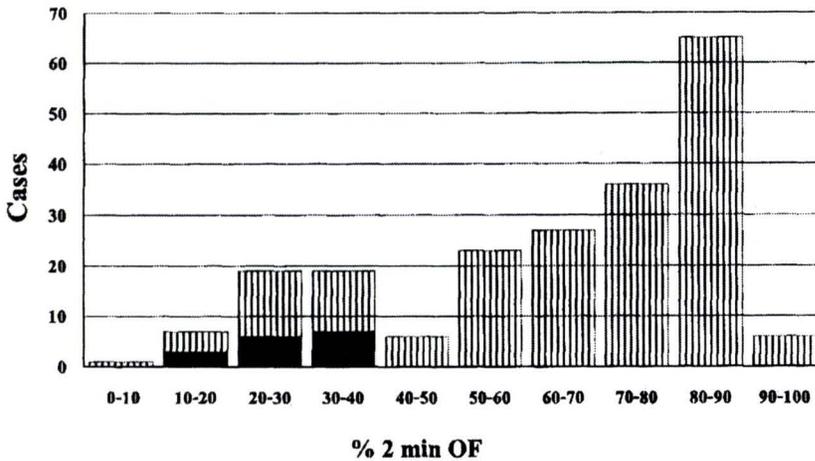
ความเกี่ยวข้องระหว่าง  $\beta$ -thalassemia trait กับวิธี 2 min OF พบว่า จากจำนวนตัวอย่างเลือด 271 ราย พบผู้ที่เป็น  $\beta$ -thalassemia trait 17 ราย มีค่า 2 min OF เฉลี่ยเท่ากับ  $27.4 \pm 6.4\%$  โดยมีค่าสูงสุดที่ 37.4% (รูปที่ 3) ดังนั้นถ้าจะใช้ 2 min OF เป็นตัวตรวจกรองหาผู้เป็น  $\beta$ -thalassemia trait ค่า 2 min OF ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า mean + 4SD ของค่าที่พบในพวก  $\beta$ -thalas-

**ตารางที่ 3** ค่าสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> จากอาสาสมัครวัดโดยวิธี A2 test และวิธี LPLC

Subject	Method	N	Hb A <sub>2</sub> in %			p
			Minimum	Maximum	Mean±SD	
Normal	A2 test	130	1.7	3.5	2.8±0.5	> 0.001
	HPLC	130	1.8	3.4	2.3±0.3	
$\beta$ -thal trait	A2 test	6	4.7	6.7	5.5±0.9	> 0.001
	HPLC	6	4.2	7.0	5.3±1.0	

**ตารางที่ 4** สัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ใน  $\beta$ -thalassemia trait 74 ราย วิเคราะห์ด้วยวิธี A2 test และ วิธี automated HPLC

% Hb A <sub>2</sub>	A2 test		HPLC	
	cases	%	cases	%
4.1 - 4.5	2	2.7	-	-
4.6 - 5.0	3	4.0	-	-
5.1 - 5.5	14	18.9	14	18.9
5.6 - 6.0	15	20.2	23	31.0
6.1 - 6.5	13	17.6	27	36.5
6.6 - 7.0	25	33.8	8	10.8
7.1 - 7.5	2	2.7	1	1.4
7.6 - 8.0	-	-	1	1.4
Mean±SD		6.08±0.76		6.03±0.51



**ภาพที่ 3** เป็นภาพแสดงการกระจายของค่า 2 min OF จากตัวอย่างเลือด 271 ราย ในจำนวนนี้มีค่า Hb A<sub>2</sub> เป็นพวก  $\beta$ -thalassemia trait (ภาพแท่งสีดำ) 17 ราย ทุกรายมีค่า 2 min OF น้อยกว่า 40% (ค่าเฉลี่ย เท่ากับ  $27.4 \pm 6.4\%$ )

semia trait คือ ต้องมีค่าน้อยกว่า 53% ในทางปฏิบัติ หรือ ค่า 2 min OF ที่น้อยกว่า 60% จะสามารถครอบคลุมผู้เป็นพาหะของ  $\beta$ -thalassemia trait ได้ 100%<sup>12</sup>

การศึกษาหาคู่เสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous  $\beta$ -thalassemia ได้ใช้ 2 min OF ตรวจสอบและ ถ้า 2 min OF activity น้อยกว่า 60% เลือดตัวอย่างนั้น ถูกนำไปวัด Hb A<sub>2</sub> ด้วยวิธี A2 test พบว่าหญิงฝากครรภ์ 6,648 ราย ให้ผล 2 min OF เป็นบวก 1,972 ราย (29.7%) ในจำนวนนี้มีผู้ที่มี Hb A<sub>2</sub> อยู่ระหว่าง 4.1-8% มีจำนวน 360 ราย คิดเป็นความชุกเท่ากับ 5.4% และเมื่อนำเลือดสามีของหญิงฝากครรภ์ 360 รายข้างต้น มาตรวจด้วยวิธี 2 min OF และในรายที่ 2 min OF มีค่าน้อยกว่า 60% สามีได้รับการตรวจต่อด้วยการวัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ด้วยวิธี A2 test จากการศึกษาดังวิธีนี้ทำให้พบคู่เสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็น homozygous  $\beta$ -thalassemia 21 คู่ และหญิงฝากครรภ์ที่เสี่ยงให้บุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียทั้ง 21 ราย ได้รับการวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธี cordocentesis และ fetal Hb typing ด้วย automated HPLC พบฟีตัส 5 ราย ให้ผลการวินิจฉัยว่าเป็น homozygous  $\beta^0$ -thalassemia และบิดามารดาของฟีตัสทั้ง 5 ราย มีค่า Hb A<sub>2</sub> เท่ากับ 6.3

กับ 5.6, 6.7 กับ 5.2, 6.3 กับ 6.0, 5.9 กับ 6 และ 7.3 กับ 6.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

### วิจารณ์

DEAE Sephadex A50 เป็น anion exchanger ที่ดี สำหรับใช้แยก Hb A<sub>2</sub> ออกจาก Hb อื่นๆ ได้แก่ Hb A, Hb F, Hb Bart's และ Hb H ซึ่ง Hb แต่ละตัว มี pH specific เช่น Hb A<sub>2</sub> ที่ pH 8.2, Hb A ที่ pH 7.8, Hb F ที่ 7.6, Bart's และ Hb H pH น้อยกว่า 7 เป็นต้น<sup>13</sup> macrocolumn เมื่อปรับปรุง และเปลี่ยนแปลง ให้มาเป็น microcolumn และพัฒนาต่อ<sup>14-17</sup> ให้มาใช้กับ syringe column ขนาด 3.5 มล. พบว่าเป็นวิธีที่สะดวก buffer ไหลผ่าน column ได้รวดเร็วและสามารถเตรียม ใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป สำหรับความแม่นยำ และความน่าเชื่อถือ วิธี A2 test ให้ผลสอดคล้องกับวิธี automated HPLC และ automated LPLC โดยเฉพาะ การตรวจ  $\beta$ -thalassemia trait วิธี A2 test ให้ค่า CV เท่ากับ 5% ขณะที่วิธี automated HPLC และ automated LPLC ให้ค่า CV เท่ากับ 1.2 และ 1.5% ตามลำดับ และเมื่อใช้วิธีนี้ไปตรวจหญิงฝากครรภ์ และอาสาสมัครให้ผลการวิเคราะห์สัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ไปใน

**ตารางที่ 5** ผลของคู่เสี่ยงที่พบในหญิงฝากครรภ์ 6,648 ราย พบคู่เสี่ยง 21 คู่ในจำนวนนี้ 5 ราย เป็น homozygous  $\beta^0$ -thalassemia

ลำดับที่	คู่เสี่ยง	HN	OF (%)	Hb A <sub>2</sub> (%)	Result of PND
1	สามี	1344591	27.5	6.2	
	ภรรยา	1344591	25.8	7.7	$\beta$ -thalassemia trait
2	สามี	1571679	28.4	5.5	
	ภรรยา	1571679	34.1	4.7	$\beta$ -thalassemia trait
3	สามี	1596095	45.1	5.0	
	ภรรยา	1596095	16.5	4.9	$\beta$ -thalassemia trait
4	สามี	1689480	34.6	7.2	
	ภรรยา	1689480	28.6	4.1	$\beta$ -thalassemia trait
5	สามี	1778306	45.9	4.8	
	ภรรยา	1778306	42.9	6.5	$\beta$ -thalassemia trait
6	สามี	1862140	32.3	4.2	
	ภรรยา	1862140	19.1	4.2	$\beta$ -thalassemia trait
7	สามี	1919944	22.3	6.3	
	ภรรยา	1919944	38.3	5.6	Homoz. $\beta^0$ -thalassemia
8	สามี	1979669	43.9	6.7	
	ภรรยา	1979669	27.0	5.2	Homoz. $\beta^0$ -thalassemia
9	สามี	2037403	33.8	5.2	
	ภรรยา	2037403	27.4	5.2	$\beta$ -thalassemia trait
10	สามี	2042735	27.4	5.8	
	ภรรยา	2042735	24.1	4.7	$\beta$ -thalassemia trait
11	สามี	2155605	17.7	4.4	
	ภรรยา	2155605	31.6	5.7	Normal
12	สามี	2175240	18.9	4.7	
	ภรรยา	2175240	54.8	4.1	$\beta$ -thalassemia trait
13	สามี	2182560	28.6	6.3	
	ภรรยา	2182560	21.6	6.0	Homoz. $\beta^0$ -thalassemia
14	สามี	2187895	38.5	6.4	
	ภรรยา	2187895	23.9	6.1	Normal
15	สามี	2205612	51.3	5.7	
	ภรรยา	2205612	23.5	6.0	Normal
16	สามี	2220256	17.3	5.4	
	ภรรยา	2220256	25.7	4.8	Normal
17	สามี	2228687	26.6	4.4	
	ภรรยา	2228687	14.1	5.2	$\beta$ -thalassemia trait
18	สามี	2233036	29.1	6.5	
	ภรรยา	2234568	31.2	4.8	$\beta$ -thalassemia trait

ตารางที่ 5 ผลของคู่เลี้ยงที่พบในหญิงฝากครรภ์ 6,648 ราย พบคู่เลี้ยง 21 คู่ในจำนวนนี้ 5 ราย เป็น homozygous  $\beta^0$ -thalassemia (ต่อ)

ลำดับที่	คู่เลี้ยง	HN	OF (%)	Hb A <sub>2</sub> (%)	Result of PND
19	สามี	2234568	21.2	5.9	Homoz. $\beta^0$ -thalassemia
	ภรรยา	2234568	22.8	6.0	
20	สามี	2236119	28.0	5.6	Normal
	ภรรยา	2236119	25.0	5.3	
21	สามี	2250409	29.0	7.3	Homoz. $\beta^0$ -thalassemia
	ภรรยา	2250409	33.1	6.4	

ทางเดียวกันกับวิธี automated HPLC และวิธี automated LPLC อย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า correlation coefficient (r)= 0.99

การวัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ทำได้หลายวิธี เช่น วิธี microcolumn DEAE cellulose บรรจุใน Pastuer pipet เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กัน และให้ผลเหมือนกับวิธี DEAE sephadex เพียงแต่การ pack column cellulose จะ pack ยากกว่า sephadex โดย cellulose ทำให้ column อุดตันได้ง่าย อย่างไรก็ตาม วิธี microcolumn DEAE cellulose กับ TRIS-glycine buffer สามารถใช้วัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ได้ดี เช่นกัน<sup>18</sup> ส่วนวิธี automated HPLC และ automated LPLC เป็นวิธีการตรวจวัดหาสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ที่ดี automated HPLC ให้ค่า Hb A<sub>2</sub> ใน  $\beta$ -thalassemia trait ค่อนข้างสูง เช่น ค่าต่ำสุดใน  $\beta$ -thalassemia trait มีค่า Hb A<sub>2</sub> เท่ากับ 4.9 ซึ่งต่างจากวิธี automated LPLC ให้ค่า Hb A<sub>2</sub> ต่ำลงเช่น เท่ากับ 4.2 เป็นต้น อย่างไรก็ตามทั้ง 2 วิธีมีข้อดีที่การวิเคราะห์ทำได้ง่ายมีความแม่นยำสูง ค่า CV ต่ำ เช่น 1-2% เป็นต้น ทั้งเครื่องมือและการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างยังมีราคาแพง ซึ่งต้องพิจารณาตามความเหมาะสมในการจัดหามาใช้

Hb A<sub>2</sub> เป็น minor Hb component ในคนปกติ พบได้ประมาณ 3% ค่าสูงสุดของคนปกติ และค่าที่น่าจะเป็น  $\beta$ -thalassemia trait มีความสำคัญในการกำหนด

การให้บริการเพื่อการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคธาลัสซีเมีย สัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> จะขึ้นสูงมาก สูงขึ้นน้อย หรืออยู่ในเกณฑ์ปกติ ขึ้นอยู่กับชนิดของ mutation ของ  $\beta$ -globin gene เช่น ในพวก silent  $\beta$ -thalassemia,  $\beta$ -globin gene mutation มักอยู่ในจุดที่ไม่ค่อยสำคัญ พวกนี้ค่า Hb A<sub>2</sub> อาจมีค่าสูงเล็กน้อยหรืออยู่ในเกณฑ์ปกติ<sup>19,20</sup> นอกจากนี้ภาวะขาดเหล็ก (iron deficiency) อาจทำให้ค่า Hb A<sub>2</sub> ใน  $\beta$ -thalassemia trait ลดลงได้<sup>21,22</sup> สัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ที่สูงเกิน 4.5-5% ขึ้นไปมักจะพบร่วมกับ  $\beta$ -thalassemia trait เช่นพวก  $\beta$ -globin gene deletion,  $\beta^0$ -thalassemia trait และ  $\beta^+$ -thalassemia trait เป็นต้น<sup>23</sup>

$\beta$ -thalassemia trait ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เลือดจากบิดา-มารดาของผู้ป่วย homozygous  $\beta^0$ -thalassemia ซึ่ง  $\beta$ -globin gene mutation เป็นพวก 4 base pairs deletion ที่ codon 41/42 (-CCTT) และพวก nonsense 17 mutation (A-T) ค่า Hb A<sub>2</sub> ของกลุ่มนี้ไม่มีผู้ใดที่มีค่า Hb A<sub>2</sub> น้อยกว่า 4.3% และคนที่มากที่สุดไม่เกิน 8.0% นอกจากนี้บิดา-มารดาของพิตัส 5 รายที่ได้รับการวินิจฉัยก่อนคลอดและเป็น  $\beta^0$ -thalassemia มีค่า Hb A<sub>2</sub> อยู่ระหว่าง 5.2 ถึง 7.3%

ท้ายที่สุดประเทศไทยมีผู้เป็นพาหะของ  $\beta$ -thalassemia trait ในอัตราที่สูง เช่นในภาคเหนือ จากการศึกษานี้พบว่า มีผู้เป็นพาหะ 5.4% และหญิงฝาก

กรรม 1,300 ราย ให้บุตรที่เป็นโรค homozygous  $\beta^0$ -thalassemia 1 ราย วิธี A2 test ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่สามารถเตรียมได้เองในห้องปฏิบัติการทั่วไป ต้นทุนต่อรายถูก วิธี A2 test สามารถวัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> ได้แม่นยำให้ค่า CV ใกล้เคียงกับวิธี automated HPLC และ automated LPLC เมื่อนำ วิธี A2 test มาใช้ร่วมกับวิธี 2 min OF จะเป็นวิธีที่เหมาะสมวิธีหนึ่งในการให้บริการทางพันธุศาสตร์ ในการควบคุมและการป้องกันการเกิดโรค homozygous  $\beta^0$ -thalassemia ในหญิงตั้งครรภ์ และอาจช่วยลดภาวะฉุกเฉินด้าน health economics ของประเทศได้

### สรุป

ได้พัฒนาวิธีการวัดสัดส่วนของ Hb A<sub>2</sub> อย่างง่ายขึ้น โดยใช้ DEAE sephadex A50 ที่ equilibrate ด้วย buffer 0.05 M TRIS-HCL 0.01% KCN pH 8.5 บรรจุลงใน disposable syringe ขนาด 3.5 มล. จำนวน 3 มล. โดยมี disposable syringe 10 มล. ทำหน้าที่เป็น reservoir Hb A<sub>2</sub> จะถูก elute แยกออกจาก Hb ชนิดอื่นด้วย 0.05 M TRIS-HCL 0.01% KCN buffer pH 8.2 ค่า Hb A<sub>2</sub> ปกติเท่ากับ 1.7-3.7% และไม่เกิน 4.1% สำหรับผู้ที่ เป็น  $\beta^0$ -thalassemia trait มีค่า Hb A<sub>2</sub> ตั้งแต่ 4.3 ขึ้นไปและไม่เกิน 8% และค่า Hb A<sub>2</sub> ที่เกิน 10% ขึ้นไป จะเป็นพวก Hb E trait

วิธีนี้เมื่อนำมาใช้กับชุมชนน่าจะเป็นวิธีตรวจกรองเพื่อ การให้บริการในการควบคุมและป้องกันโรค homozygous  $\beta^0$ -thalassemia ชนิดร้ายแรงได้

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณอารีรัตน์ ปัญญาเขียว ที่ช่วยทำงานด้านห้องปฏิบัติการ คุณกนกวรรณ ปิ่นทอง ช่วยพิมพ์ผลงานทางวิชาการในการเสนอรายงานครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Sanguansermsri T, Steger HF, Sirivatanapa P, et al. Prevention and Control of Severe Thalassemia Syndrome : Chiang Mai Strategy. *Thai J Hematol Transf Med* 1998;8:207-14.
2. VARIANTTM Beta-Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Diagnostics, California, USA, 1994.
3. Chamber K, Phillips A, Chapman CS. Use of low pressure liquid chromatography system hemoglobinopathy screening. *Clin Lab Haematol* 1993;15:119-28.
4. Jenkin MA, Hendy J, Smith ZL. Evaluation of hemoglobin A2 quantitation assay and hemoglobin variant screening by capillary electrophoresis. *J Capillary Electrophori* 1997;4:137-43.
5. Cotton F, Lin C, Fontiane B, et al. Evaluation of capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A<sub>2</sub> and F. *Clin Chem* 1999;45:237-43.
6. Mario N, Baudin B, Aussen C, Giboudeau J. Capillary isoelectric focusing and high performance cation exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. *Clin Chem* 1997;43:2137-42.
7. Mario N, Baudin B, Giboudeau J. Qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing. *J Chromatogr Biomed Sci Appl* 1998;706:123-9.
8. The Hb Gold analyser. HbGold; User Manual. Drew scientific Limited Sowerby Woods Business Park Barrow-in-Furness Cumbria LA144QR United Kingdom. May 1, 1998.
9. Sanguansermsri T, Phumyu N, Chomchuen S, Steger HF. Screening for  $\alpha$ -thalassemia-1 heterozygotes in expecting couples by the combination of a simple erythrocyte osmotic fragility test and a PCR based method. *Community Genetics* 1999;2:26-9.
10. Chamrasatanakorn T, Sanguansermsri T, Punyakeaw A. Two minutes Osmotic Fragility Test (2 MIN OF) and Severe Thalassemia Trait Screening. *Bull Chiang*

- Mai Assoc Med Sci 1998;31:28-31.
11. Laig M, Sanguansermsri T, et al. The spectrum of  $\beta$ -thalassemia mutations in northern and northeastern Thailand. *Human Genet* 1988;84:47-50.
  12. จรรย์ จันทลักษณ์. ความกระจาย (Distribution). สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด 2540:31-9.
  13. Huisman THJ, Jonxis JHP. The Hemoglobinopathies. Techniques of Identification. New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 1977:105-15.
  14. Toewsiri P, Chonua P, Sanguansermsri T, et al. Simple determination of Hb A<sub>2</sub> for the detection of heterozygous  $\beta$ -thalassemia. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 1977;10:17-24.
  15. Efremov GD. An evaluation of the methods for quantitation of hemoglobin A<sub>2</sub>-results from a survey of 10, 633 cases. *Hemoglobin* 1977;1:845-60.
  16. Chamrasatanakorn T, Sanguansermsri T, Punyakeaw A. A modified microcolumn chromatography for Hb A<sub>2</sub> Determination. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 1998;31:32-5.
  17. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, มาริดา พรพัฒน์กุล, ปราณีย์ ฟูเจริญ, สุพรรณ ฟูเจริญ, ทศนีย์ เล็บนาค. Quantitation of Hb A2 and Hb E by DEAE-Sephadex Microcolumn Chromatography. ใน: ทัลส์ซีเมีย คู่มือการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ (ทศนีย์ เล็บนาค, ปราณีย์ ฟูเจริญ บรรณาธิการ) มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย 2540:57-60.
  18. Huisman TH, Schroeder WA, Brodic AN, et al. Microchromatography of hemoglobin II. A simplified procedure for the determination of Hb A<sub>2</sub>. *J Lab Clin Med* 1975;86:700-2.
  19. Bianco I, Cappabianca MP, Foglietta E, et al. Silent thalassemia : genotypes and phenotypes. *Hematologica* 1997;82:269-80.
  20. Galanello R, Barella S, Gasperini D, et al. Genotype of subjects with borderline hemoglobin A<sub>2</sub> level: implication of beta-thalassemia carrier screening. *Am J Hematol* 1994;46:79-81.
  21. Wasi P, Disthasangchan P, Na Nakorn S. The effect of iron deficiency on the levels of Hb A<sub>2</sub> and Hb E. *J Lab Clin Med* 1968;71:85.
  22. วิชัย เหล่าสมบัติ. Beta-thalassemia minor. ใน: วิชัย เหล่าสมบัติ, บรรณาธิการ. ทัลส์ซีเมีย (Thalassemia). กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์ 2541:82-5.
  23. Huisman TH. Level of Hb A<sub>2</sub> in heterozygotes and homozygotes for beta-thalassemia mutations : influence of mutations in the CACCC and ATAA motifs of the beta-globin gene promotor. *Acta Haematol* 1997;98:187-94.

## A2 Test: A Simple Method for the Screening of $\beta^0$ -Thalassemia Trait

Torpong Sanguansermsri, Pranoot Tanpaiboon, Sangduan Wongmaeta\*,  
Surasit Chomchuen, and Thasaneeya Chamrasratanakorn

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, \*Health Promotion Center Region 10,  
Chiang Mai, Thailand.

**Rationale** Hb A<sub>2</sub> is normally found 3% in human blood samples. Its proportion increases in  $\beta$ -thalassemia trait and dramatically increases in the severe  $\beta$ -thalassemia trait cases. There are more than 30 types of  $\beta$ -globin gene mutation which cause  $\beta$ -thalassemia trait in Thailand. But the proportions of only few are necessary to be determined by an appropriate method in order to control and prevent the severe homozygous  $\beta^0$ -thalassemia in the Thai population. **Method:** The A2 test is a method developed from microcolumn DEAE sephadex A 50 chromatography using a 3.5 mL disposable syringe as a column and a 10 mL one as a reservoir for the measurement of Hb A<sub>2</sub>. The CV and correlation coefficients (*r*) of the A2 test were compared to automated HPLC and LPLC methods. The method was applied for determination of Hb A<sub>2</sub> in blood samples of normal and severe  $\beta$ -thalassemia trait cases. **Results:** The CV of A2 test method was 7.9% whereas automated HPLC and LPLC methods were 1.8% and 2.4% respectively. The correlation coefficient (*r*) obtained from the determination of Hb A<sub>2</sub> by A2 test and automated HPLC in 300 pregnant women and by A2 test and automated LPLC in 149 healthy volunteers was all found to be 0.99. The average HbA<sub>2</sub> in 74  $\beta$ -thalassemia trait cases determined by A2 test was  $6.08 \pm 0.76\%$ . The lowest value was 4.3% and the highest was 7.5%. Four hundred forty nine blood samples determined by A2 test were classified into 3 groups i.e., three hundred eighty five non- $\beta$ -thalassemia trait cases with average HbA<sub>2</sub> of  $2.9 \pm 0.4\%$  (1.7-3.7%), 22  $\beta$ -thalassemia trait cases with average Hb A<sub>2</sub> of  $5.4 \pm 0.6\%$  (4.5-6.7%) and 39 Hb E cases with over 10% of Hb A<sub>2</sub>. Finally, 6,448 pregnant women were screened by Hb A<sub>2</sub> value of 4.1-8.0%, 21 couples were found to be at risk. Five cases in those couples were found to be homozygous  $\beta$ -thalassemia and the Hb A<sub>2</sub> of the parents were between 5.2-7.3%.

**Discussion and Summary:** The A2 test is a simple method with a low CV for the determination of Hb A<sub>2</sub>. The results correspond with the automated HPLC and LPLC methods. It can be conducted in general laboratories at low cost. An Hb A<sub>2</sub> value of between 4.3-8.0% indicated a severe  $\beta$ -thalassemia trait. It is therefore considered to be an alternative method for diagnosing severe  $\beta$ -thalassemia trait, which can help control and prevent of the homozygous  $\beta$ -thalassemia in Thailand.

**Key Words :** ● Hb A<sub>2</sub> ● Screening method ●  $\beta$ -thalassemia trait

*Thai J Hematol Transf Med* 2000;10:17-28.