

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์ Fetal Hemoglobin เพื่อการวินิจฉัยก่อนคลอด Homozygous α -Thalassemia 1 ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography

ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, Heinrich F. Steger, ทศนียา จำรัสรัตนกร, สุรสิทธิ์ ชมชื่น,

ธีระ ทองสง*, พรธนี ศิริวรรณภา* และ พงษ์ส จันทรประภาพ*

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์, *ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ: วิธีการวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous α -thalassemia 1 (Hb Bart's hydrops fetalis) ที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือ ใช้วิธีการวิเคราะห์ DNA ที่ได้จากการทำ chorionic villi sampling วิธีนี้ แม้มีความแม่นยำสูง และสามารถให้การวินิจฉัยก่อนคลอดได้ตั้งแต่อายุครรภ์ 8-12 สัปดาห์ แต่มีข้อเสียคือ มีขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการที่ค่อนข้างยุ่งยาก และอาจให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้ จากการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อจากมารดา การวิเคราะห์ชนิดของ Hb เช่น Hb F และ Hb A ซึ่งไม่สามารถสร้างได้ในฟีตัส ที่เป็นโรค Hb Bart's hydrops fetalis จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของวิธีการวินิจฉัยก่อนคลอด **วิธีการ:** เลือดฟีตัสอายุ 18-22 สัปดาห์ ที่ได้จากการทำ cordocentesis ของหญิงฝากครรภ์ที่อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous α -thalassemia 1 32 ราย ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR α -thalassemia 1 (SEA type) และวัดสัดส่วนของ Hb ต่างๆ ในเครื่อง automated HPLC **ผลการศึกษา:** จากจำนวนฟีตัส 32 ราย ตรวจสอบด้วยวิธี PCR α -thalassemia 1 พบเป็น homozygous α -thalassemia 1 8 ราย เป็น α -thalassemia 1 trait 14 ราย เป็น Hb E/ α -thalassemia 1 3 ราย และ ไม่พบ α -thalassemia 1 gene 7 ราย ผลการศึกษา fetal Hb typing ของแต่ละกลุ่มข้างต้น พบว่ามีภาพ chromatogram ที่จำเพาะคือ พวกที่เป็น homozygous α -thalassemia 1 chromatogram จะมีแค่ peak ของ unbound Hb (Hb Bart's และ Hb Portland) และไม่มี Hb F Hb A และ Hb A₂ chromatogram ของ α -thalassemia 1 trait ทุกรายมี peak ของ unbound Hb, peak ของ pre Hb F, peak ของ Hb F และ peak ของ Hb A และ chromatogram ของฟีตัสปกติทุกรายมี peak ของ Hb F และ Hb A ไม่มี Hb A₂ สัดส่วนของ Hb A อยู่ระหว่าง 4-7% สัดส่วนนี้ไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงอายุ 18-22 สัปดาห์ **วิจารณ์และสรุป:** การวิเคราะห์ชนิดของ Hb ด้วย HPLC สะดวกรวดเร็วไม่มีความยุ่งยากให้ผลสอดคล้องและตรงกับวิธี PCR α -thalassemia 1 โดย fetal Hb typing ของ homozygous α -thalassemia 1 มีลักษณะจำเพาะ กล่าวคือ ไม่พบมีสัดส่วนของ Hb F และ Hb A ซึ่งต่างจากฟีตัสที่เป็น α -thalassemia 1 trait และฟีตัสปกติซึ่งพบทั้ง Hb F และ Hb A วิธี fetal Hb typing ด้วย automated HPLC สามารถใช้เป็นวิธีวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous α -thalassemia 1 ได้ มีความถูกต้องและแม่นยำสูง วิธีการวิเคราะห์ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ดังนั้นวิธีนี้จะเหมาะสมกับประเทศไทยที่ใช้สำหรับการวินิจฉัยก่อนคลอดของหญิงเสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous α -thalassemia 1 ในโครงการการควบคุมและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง

Key Words : ● PND ● Homozygous α -thalassemia 1 ● Fetal Hb typing ● HPLC

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2542;9:283-92.

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 5 ตุลาคม 2542 และให้ตีพิมพ์เมื่อ 8 พฤศจิกายน 2542

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อกับ น.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

การวินิจฉัยก่อนคลอดเป็นขบวนการที่มีความจำเป็น และเป็นส่วนหนึ่งของการบริการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย โดยที่โรค homozygous α -thalassemia 1 (หรือโรค Hb Bart's hydropsfetalis) เป็นโรคร้ายแรงพบได้บ่อยในประเทศไทย พิตส์ที่ป่วยด้วยโรคนี้จะเสียชีวิตในครรภ์หรือเกิดมาแล้วอยู่ได้ไม่กี่ชั่วโมง นอกจากนั้นมารดา กว่าร้อยละ 50 มีโรคแทรกซ้อนชนิดร้ายแรง เช่น toxemia of pregnancy และหรือโรค post partum hemorrhage ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อชีวิตมารดาได้ จากการศึกษาในเขตภาคเหนือ พบว่าประชากร ร้อยละ 9 เป็นพาหะของยีน α -thalassemia 1 และหญิงตั้งครรภ์ 1,000 ราย จะให้บุตรเป็นโรค homozygous α -thalassemia 1 อย่างน้อย 2 ราย^{1,2} การตรวจคัดกรองและการวินิจฉัยก่อนคลอดของหญิงฝากครรภ์จึงมีความจำเป็นและทำให้สามารถหยุดการตั้งครรภ์ก่อนภาวะโรคแทรกซ้อนร้ายแรงเกิดขึ้น

ในการรายงานครั้งนี้เป็นการรายงานผลการศึกษา การใช้ fetal Hb typing โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง automated high performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อการวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous α -thalassemia 1 ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเลือด เป็นเลือดตัวอย่างของพิตส์จำนวน 32 ราย ที่ได้จากการทำ cordocentesis ของหญิงฝากครรภ์เสี่ยงที่จะให้บุตร เป็นโรค homozygous α -thalassemia 1 และมีอายุ อยู่ระหว่าง 18-22 สัปดาห์ หญิงฝากครรภ์เหล่านี้เป็นคู่เสี่ยงที่ถูกค้นพบในขณะที่มาฝากครรภ์และเข้าโครงการการควบคุมและการป้องกันการเกิดบุตรที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง โดยการตรวจคัดกรองด้วยวิธี 2 minute osmotic fragility test³ และถูกยืนยันความเป็นคู่เสี่ยงที่จะให้บุตรเป็นโรค ho-

mozygous α -thalassemia 1 ด้วยการตรวจ PCR α -thalassemia 1 ชนิด SEA type⁴ โดยมีผลของ PCR α -thalassemia 1 เป็น α -thalassemia 1 trait ทั้งคู่

วิธีการ เลือดพิตส์ที่ได้มานำไปตรวจย้อมดูการปนเปื้อนเลือดมารดาด้วยวิธี acid elution ก่อนจะนำไปตรวจ fetal Hb typing และ ตรวจยีน α -thalassemia 1

Acid elution test เป็นวิธีตรวจแยกชนิดของเม็ดเลือดแดงที่มี Hb F และ Hb A น้ำยาย้อมประกอบด้วย 0.1% amido black 10 B ใน 80% ethyl alcohol HCl pH 2 วิธีตรวจ ทำ blood smear บางๆ ทั้งให้ slide แห้งประมาณ 30 นาที นำ slide ไปจุ่ม fixed ใน 80% ethyl alcohol 3 นาที ย้อมโดยการจุ่มแช่ในน้ำยา amido black อีก 3 นาที ล้างสีบนแผ่น slide ด้วยน้ำประปาที่ไหลรินๆ 1-2 นาที ตากให้แห้งแล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายขนาด 40 เท่า เม็ดเลือดพิตส์จะติดสีน้ำเงินเข้ม ขณะที่ ถ้ามีเม็ดเลือดแดงของมารดาที่ปนมาจะเป็น cell เม็ดเลือดแดงที่ไม่มี hemoglobin มองดูเป็น ghost cell⁵

Fetal hemoglobin typing นำเลือด พิตส์ 5 ไมโครลิตรมาละลายใน 1 มล. ของ hemolysis buffer ก่อนนำไปเข้าเครื่อง automated HPLC (variant hemoglobin testing system) และใช้ β -thalassemia short program ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 6 นาที ในการวิเคราะห์แต่ละฮีโมโกลบินตัวอย่าง นอกจากนี้ในการวัดปริมาณ Hb Bart's ทำได้โดยนำเลือดพิตส์ ไปวิเคราะห์ในเครื่อง regular HPLC (Bio Rad HRLC 800) โดยใช้ 2 mM Bis Tris - 2 mM Bis Tris 0.5M NaCl เป็น buffer และ gradient⁷

PCR α thalassemia 1 (SEA types)

เตรียม DNA จากเลือด เพื่อเป็น template นำ packed RBC 30 ไมโครลิตร ละลายด้วย lysis buffer 1 มล. (0.5% triton X - 100) ปั่นที่ 14,000/min ตะกอนที่ได้เติม sterile deionized H₂O 1 ซีซี ปั่น

14,000/min ดูด supernatant ออกให้มากที่สุดเติม 2 หยดของ Chelex 100 suspension แล้วเติม sterile deionized water 110 ไมโครลิตร incubate ที่ 55°C 2 ชั่วโมง mix โดย vortex แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เก็บไว้ที่ 5°C ก่อนนำมาใช้เป็น template เพื่อการวิเคราะห์ DNA⁹

PCR α thalassemia 1 PCR mixture ประกอบด้วยแต่ละตัวของ 20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM Mg Cl₂, 0.1 mg/mL BSA, 0.05% Tween 20, 200 μ M ของ d ATP, dCTP, dGTP ,dTTP, 0.375 μ M ของ primer แต่ละตัว, 0.02 U/ μ L ของ Tag DNA polymerase, 0.0125% ของ xylene cyanol, 7.5% glycerol และ 4 ไมโครลิตร DNA template

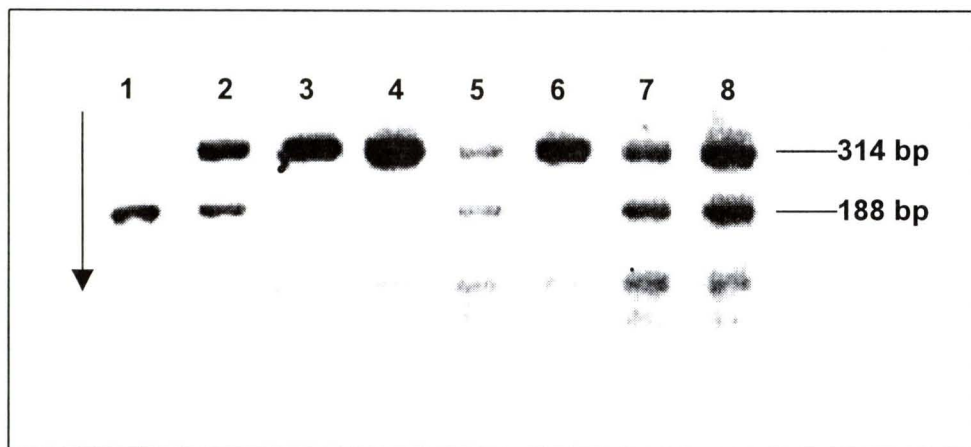
Primer 1 5' GCG ATC TGG GCT GTG
TGT TCT 3'

Primer 2 5' GTT CCC TGA GCC CCG
ACA CG 3'

Primer 3 5' GCC TTG AAC TCC TGG
ACT TAA 3'

นำ tube mixture ไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (gene Amp PCR system 2,400 Perkin - Elmer) ตั้งเครื่อง โดย denaturation ที่ 94°C 2 นาทีที่เครื่องต่อด้วย program denaturation 94°C 30 วินาที annealing 58°C 1 นาที extension 72°C อีก 1 นาที อีก 35 รอบ เมื่อครบแล้วต่อด้วย extension ที่ 72°C อีก 5 นาที แล้วนำไปปั่น 14,000/min ให้ตะกอนตกอยู่ที่ก้น tube นำ supernatant ไปตรวจ PCR product ด้วย 3% agarose gel electrophoresis ซึ่งมี 0.5 μ g/mL ของ ethidium bromide ตรวจดู band ด้วยแสง ultraviolet จะพบว่าเลือดฟัตัสที่ไม่มียีน α -thalassemia 1 พบ band ของ PCR product band เดียว คือ 314 bp α -thalassemia 1 trait พบ 2 bands คือ 314 และ 188 bp ขณะที่ homozygous α -thalassemia 1 จะพบ band เดียวขนาด 188 bp (รูปที่ 1)

DNA Sequencing Exon 1 และ Exon 2 ของ β -globin gene ถูก amplified จะได้ DNA product ขนาด 761 bp ซึ่งถูกนำไป purify ด้วย Qiagen PCR purification kit ก่อน การหาลำดับของ DNA base ใช้ Perkin-Elmer dRhodamine sequencing kit



รูปที่ 1 PCR product วิเคราะห์ด้วย PCR α -thalassemia 1 (SEA) ของฟัตัส บน 3% agarose gel electrophoresis ช่องที่ 1 เป็น homozygous α -thalassemia 1 เห็น band เดียวของ 188 bp ช่องที่ 2, 5, 7 และ 8 เป็น α -thalassemia 1 trait พบ DNA สอง bands คือ 188 และ 314 bp และ ช่องที่ 3, 4 และ 6 เป็นของฟัตัส ปกติมี band เดียวคือ 314 bp

และนำไปทำ DNA sequencing ในเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer⁹

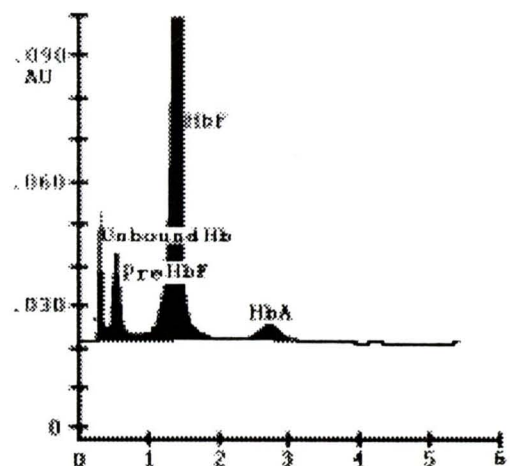
ผลของการศึกษา

ผลการวินิจฉัยเลือดของฟิตัส 32 ราย ด้วยวิธี PCR α -thalassemia 1 (SEA type) พบว่ามีฟิตัสที่ไม่มี α -thalassemia 1 gene 7 ราย ให้ band ของ PCR product ขนาด 314 bp band เดียว พบฟิตัส α -thalassemia 1 trait ให้สอง band คือ 314 และ 188 bp มี 17 ราย และ homozygous α -thalassemia 1 พบ PCR product band เดียว คือ 188 bp มี 8 ราย (ตารางที่ 1) การวิเคราะห์ Hb ด้วย automated HPLC ของกลุ่มฟิตัส 7 ราย ที่ไม่มี α -thalassemia 1 gene หรือฟิตัสปกติ พบ Hb component ที่สำคัญ คือ Hb F และ Hb A ที่ retention time 1.2 และ 2.4 นาที ตามลำดับและไม่พบมี retention time ของ Hb A₂ Hb อื่นที่พบคือ หน้าต่อ Hb F peak พบ pre Hb F peak และ unbound Hb peak ให้สัดส่วนต่างๆ ฟิตัสในกลุ่มนี้มีอายุ 18 สัปดาห์ 3 ราย 19 สัปดาห์ 1 ราย 20 สัปดาห์ 1 ราย 21 สัปดาห์ 1 และ 22 สัปดาห์ 1 ราย โดยมีสัดส่วนของค่า Hb A เท่ากับ 4.7, 4.1, 4.6, 6.8, 6.3, 4.7 และ 4.8% ตามลำดับ สัดส่วนที่เหลือเป็น Hb F (รูปที่ 2) สำหรับคู่เลี้ยงที่เป็นบิดาและมารดาของ ฟิตัสกลุ่มนี้ทุกคู่ นอกจากเป็น α -thalassemia 1 trait

ทั้งคู่แล้ว ทุกราย มีค่า Hb A₂ อยู่ในเกณฑ์ปกติ ยกเว้น มีหนึ่งรายที่เป็น Hb E trait โดยมีค่า Hb E เท่ากับ 14%

สำหรับฟิตัส 8 ราย ที่การวิเคราะห์ DNA พบว่า เป็น homozygous α -thalassemia 1 ภาพ chromatogram ของกลุ่ม นี้เหมือนกันทุกราย คือมีแต่ peak ของ unbound Hb ไม่มี peak ของ Hb F หรือ Hb A (รูป

SAMPLE ID#	0000000000000000000250		
ANALYTE ID	X	TIME	AREA
F	99.1	1.24	1468352
A ₂	4.7	2.50	76283
	TOTAL AREA		1544635
%	99.1% A2		0.0%



รูปที่ 2 Chromatogram ของฟิตัสปกติ

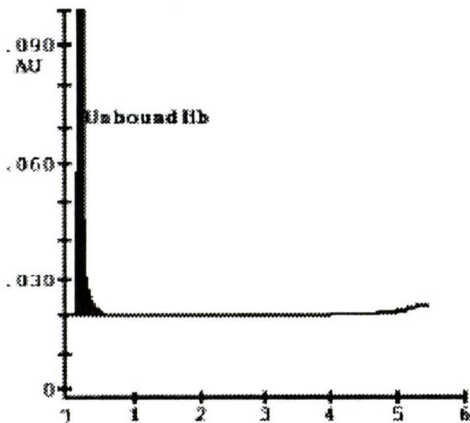
ตารางที่ 1 ผล PCR α -thalassemia 1 ของฟิตัสใน 32 คู่เลี้ยงที่อาจให้บุตรเป็น homozygous α -thalassemia 1

Fetal age (week)	Neg for α -thalassemia 1 gene	α -thalassemia 1 trait	Homozygous α -thalassemia 1
18	3	2	2
19	1	4	-
20	1	10	1
21	1	1	4
22	1	-	1
Total	7	17	8

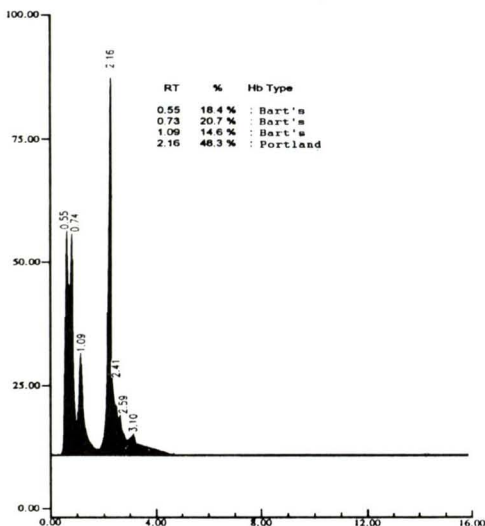
ที่ 3) และเมื่อนำเลือดไปวิเคราะห์ใน regular HPLC unbound peak ส่วนใหญ่ เป็น Hb Bart's ส่วนน้อย เป็น embryonic Hb คือ Hb Portland มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $37.4 \pm 16.8\%$ และไม่พบ Hb F และ Hb A (รูปที่ 4)

สำหรับกลุ่มที่ DNA ของ α globin gene เป็น

SAMPLE ID#	00000000000000000079		
ANALYTE ID	%	TIME	AREA
	TOTAL AREA		0
F	0.0%	AZ	0.0%



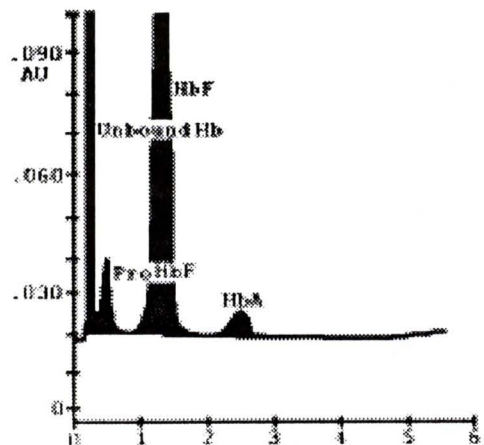
รูปที่ 3 Homozygous α -thalassemia 1



รูปที่ 4 Chromatogram ของ homozygous α -thalassemia 1 เป็นการวิเคราะห์ด้วย regular HPLC

แบบ α -thalassemia 1 trait ทั้งหมด 17 ราย chromatogram 14 ราย มีลักษณะเฉพาะประกอบด้วย peak ของ unbound Hb ซึ่งให้สูงเต็ม scale, pre Hb F peak, Hb F และ Hb A ไม่มี peak ของ Hb A₂ (รูปที่ 5) อีก 3 ราย ลักษณะ chromatogram เหมือน α -thalassemia 1 trait แต่มี peak ของ Hb เพิ่มขึ้น ตรงกับ retention time ของ Hb A₂ ซึ่งต้องไม่ใช่ HbA₂ เมื่อตรวจสอบข้อมูลของคู่เสี่ยงพบว่า คนหนึ่งในแต่ละคู่ เป็นพาหะของ Hb E โดยมีค่า Hb E เท่ากับ 20.8, 24.7 และ 19.1 % นอกจากนี้เมื่อนำเลือดของพี่ดัสทั้ง 3 รายไปทำ DNA sequencing ของ β -globin gene พบว่า codon 26 ของ β -globin gene ข้างหนึ่งมี mutation จาก GAG เป็น AAG ซึ่งเป็นลักษณะ mutation ที่พบใน Hb E (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงให้ chromatogram ของทั้ง 3 รายที่พบ Hb E เป็น Hb E/ α -thalassemia 1 (รูปที่ 7) โดยมีค่าสัดส่วนของ Hb A เท่ากับ 3.3, 3.1, 5.6 และ Hb E เท่ากับ 1.4, 1.4 และ 1.3% ตามลำดับ

SAMPLE ID#	00000000000000000037		
ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	100.1	1.19	1169462
Az	7.4	2.40	92899
TOTAL AREA			1262361
F	100.1%	AZ	0.8%



รูปที่ 5 α -thalassemia 1 trait

วิจารณ์

การวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous α -thalassemia 1 (Hb Bart's hydrops fetalis) โดยการวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินที่ได้จากการทำ cordocentesis ในหญิงฝากครรภ์ที่อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous α -thalassemia 1 ให้ภาพของ chromatogram 3 แบบคือ homozygous α -thalassemia 1, α -thalassemia 1 trait และผู้ที่ไม่มียีนของ α -thalassemia 1 แต่ละชนิดของ α -thalassemia มีลักษณะ chromatogram เฉพาะ เช่น พิตัสที่ไม่มี α -thalassemia 1 gene จะปรากฏ peak ของฮีโมโกลบิน 4 peak คือ peak unbound Hb, peak pre Hb F ในปริมาณต่ำๆ major และ minor component คือ Hb F และ Hb A ซึ่งมีค่า retention time ที่ 1.2 และ 2.5 นาที ตามลำดับและไม่ปรากฏ peak ของ Hb A₂ สัดส่วนของ Hb A มีค่าอยู่ระหว่าง 4.1 - 6.8% สำหรับ chromatogram ของ α -thalassemia 1 trait มีลักษณะเฉพาะคือมีปริมาณของ peak ของ unbound Hb ในสัดส่วนที่สูงมากเห็นได้ชัดเจน unbound Hb นี้เมื่อนำวิเคราะห์ในเครื่อง regular HPLC พบเป็น Hb Bart's มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $20.1 \pm 3.1\%$ ($n = 9$) เป็นต้น (รูปที่ 8) สำหรับ ผู้ที่เป็น Hb E/ α -thalassemia 1 chromatogram จะมีภาพที่เหมือนนัก α -thalassemia 1 แต่มี peak ของ Hb E เพิ่มขึ้น และมี retention

time อยู่ ตรงกับ Hb A₂ ในผู้ใหญ่คือที่ 3.5 นาที หลักฐานที่สนับสนุน retention time ที่ 3.5 นาที ของพิตัสอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ น่าจะเป็น Hb E ทั้งนี้เพราะหนึ่งในคู่เสี่ยงเป็น Hb E carrier และเมื่อนำเลือดของพิตัส ทั้ง 3 รายไป ศึกษา β -globin gene mutation โดยวิธี DNA sequencing พบ DNA mutation ที่ codon ที่ 26 ตำแหน่งที่ 1 มีทั้ง G และ A ซึ่งเป็นลักษณะ mutation ที่พบใน Hb E trait (รูปที่ 6) แสดงให้เห็นว่า Hb peak ที่ retention time ที่ 3.5 นาที น่าจะเป็น peak ของ Hb E และไม่ใช่ Hb A₂ สำหรับพิตัส homozygous α -thalassemia 1 chromatogram มีแต่ unbound Hb เลือดของพิตัสชนิดนี้วิเคราะห์ ด้วย regular HPLC พบว่า unbound Hb เป็น Hb Bart's และเป็น major Hb component โดยมี minor component เป็น Hb Portland และไม่พบ HbF, HbA หรือ Hb E (HbA₂) ผลของ Hb typing ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC สอดคล้องกับวิธี Hb electrophoresis ที่เคยรายงานไว้¹⁰

Hb A พบทุกรายใน พิตัส ปกติ และรวมทั้งพิตัสที่เป็น α -thalassemia 1 trait สัดส่วนของ HbA ในพิตัสปกติระหว่างอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ ดูเหมือนว่าไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุ คือ มีค่าอยู่ระหว่าง 4-7% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าสัดส่วนของ Hb A ในพิตัสปกติ และ α -thalassemia 1 trait พิตัส

Fetal age (week)	% Hb A	
	Normal	α -thalassemia 1 trait
18	4.7, 4.1, 4.6	3.5
19	6.8	6.1, 8.1, 4.1, 3.1
20	6.3	8.5, 7.4, 9.2, 3.8, 5.7, 6.8, 6.6, 7.0
21	4.7	9.6
22	4.8	-
Means $\pm$ 1SD	4.7 $\pm$ 0.92	6.7 $\pm$ 2.05

Hb A₂ ไม่พบในฟีตสปกติช่วงอายุ 18-22 สัปดาห์ ถ้าพบจะต้องเป็น Hb E อย่างในฟีตส 3 รายที่เป็น Hb E/ α -thalassemia1 บิดาและมารดานอกจากเป็นคู่เสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็น homozygous α -thalassemia 1 แล้ว หนึ่งในคู่เสี่ยงยัง เป็น HbE trait และการตรวจ β -globin gene ด้วยวิธี DNA sequencing ในฟีตสทั้ง 3 ราย พบเป็น Hb E trait จึงนำไปได้ว่า Hb ที่ปรากฏในฟีตสด้วยวิธี HPLC ตรง retention time ของ Hb A₂ ควรต้องเป็น Hb E และไม่ใช่ Hb A₂

วิธีการวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค homozygous α -thalassemia 1 ทำได้หลายวิธี เช่น การใช้วิธี ultrasonography วิธีนี้ใช้เครื่อง ultrasound ตรวจขนาดของรก ขนาดของอวัยวะภายในต่างๆ ของฟีตสที่เปลี่ยนไป เช่น หัวใจโตขึ้น (cardio-thoracic ratio) ความผิดปกติดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ในฟีตสตั้งแต่อายุ 18-20 สัปดาห์ การวินิจฉัยก่อนคลอดวิธีนี้มารดาไม่ต้องเจ็บตัวจากการตรวจ¹¹⁻¹³ แต่วิธีที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือ PCR based method ของ α -thalassemia 1 (SEA type)¹⁴⁻¹⁷ DNA template ที่นำมาใช้มาจาก chorionic villi สามารถให้การวินิจฉัยโรคได้ เมื่อฟีตสอายุ 8-12 สัปดาห์ หรือจากเซลล์ amniocytes ตั้งแต่อายุ 16 สัปดาห์¹⁸ วิธีดังกล่าวมีความแม่นยำสูง เมื่อนำวิธี PCR based ของ α -thalassemia 1 กับวิธี fetal Hb typing ด้วย automated HPLC มาตรวจเลือดฟีตส ทั้ง 32 รายพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน อย่างไรก็ดีตาม PCR based method มีหลายขั้นตอน และต้องใช้ manual skill มากนอกจากนี้ เนื้อเยื่อของรกที่ได้มาจากการทำ biopsy ที่เรียกว่า chorionic villi sampling หรือ amniocytes ได้มาจากการทำ amniocentesis อาจปนเปื้อน เซลล์จากเลือดหรือเนื้อเยื่อภายในโพรงมดลูกของมารดา อาจทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้¹⁹ ซึ่งในบางรายอาจต้องต่อด้วยการทำ cordocentesis และให้การวินิจฉัยก่อนคลอดโดยการวิเคราะห์ fetal Hb typing ด้วย HPLC

ท้ายที่สุด fetal hemoglobin typing ของโรค homozygous α -thalassemia 1 ด้วย automated HPLC เคยมีรายงานมาบ้างแล้ว^{7,20,21} ทำให้มั่นใจได้ว่าการวินิจฉัยก่อนคลอดวิธีนี้จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการให้บริการการควบคุมและป้องกันการเกิดโรค homozygous α -thalassemia 1 ได้

สรุป

การวินิจฉัยก่อนคลอดสำหรับคู่เสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็น homozygous α -thalassemia 1 โดยใช้ fetal Hb typing วิเคราะห์ด้วย HPLC เป็นวิธีทางห้องปฏิบัติการที่สะดวกให้ผลรวดเร็วราคาถูก ผลการวิเคราะห์สามารถกำหนดชนิดของ α -thalassemia ได้ โดยภาพ chromatogram ของ homozygous α -thalassemia 1 ต่างไปจากฟีตสปกติ และฟีตสที่เป็น α -thalassemia 1 trait อย่างชัดเจน นอกจากนี้วิธีการเจาะเลือดจากสายสะดือสามารถทำได้ง่าย และมีอัตราการสูญเสียฟีตสค่อนข้างต่ำ น้อยกว่า 2% จึงเหมาะที่จะเป็นวิธีการให้การวินิจฉัยก่อนคลอดของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิด homozygous α -thalassemia 1 สำหรับประเทศไทยต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณอารีรัตน์ ปัญญาเขียว คุณโสภา ทาปัญญา ที่ช่วยงานด้านห้องปฏิบัติการ คุณรัตนภรณ์ เสขรฤทธิ์ คุณอภิรัตน์ ตรรกไพจิตร ที่ช่วยในการปรึกษาทางพันธุกรรมและหาข้อมูลเกี่ยวกับภาควิทยาศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคุณกนกวรรณ ปิ่นทอง ที่ช่วยพิมพ์ผลงานเสนอนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Sanguanserm Sri 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. Lemmens-Zygułska M, Eibel A, Helbig B, Sanguan-sermsri T, Horst J, Flatz G. Prevalence of α -thalassemia in northern Thailand. Hum Genet 1996;98:345-7.
3. Sanguansermsri T, Phumyu N, Chomchuen S, Steger HP. Screening for α -thalassemia-1 heterozygotes in expecting couples by the combination of a simple erythrocyte osmotic fragility test and a PCR based method. Community Genetics 1999;2:1 in press.
4. Budsakorn Kitsirisakul, Heinrich F Steger, Torpong Sanguansermsri. Frequency of α -thalassemia-1 of the southeast asian-type among pregnant women in northern Thailand determined by PCR technique. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1996;35: 362-3.
5. Betke K, Sanguansermsri T. Zytologische Blutfarbstoff differenzierung Möglichkeiten, Ergebnisse und Nutzenwendungen. Munch Med Wschr 1972;114: 1099-104.
6. VARIANTTM Beta-Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Diagnostics, California, USA, 1994.
7. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, มารีดา พรพัฒน์กุล, ปราณีย์ ฟูเจริญ, สุพรรณ ฟูเจริญ, หักนีย์ เลื่อนาค. Diagnosis of thalassemia and abnormal hemoglobins by automated HPLC. ใน: หักนีย์ เลื่อนาค, ปราณีย์ ฟูเจริญ บรรณาธิการ. ชาติส์ซีเมีย คู่มือ การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. มูลนิธิโรคโลหิตจางชาติส์ซีเมีย แห่งประเทศไทย 2540:65-73.
8. Steger HF, Phumyu N, Sanguansermsri T. The development of a PCR kit for the detection of α -thalassemia-1 of the Southeast Asian type (SEA). Chiang Mai Medical Bulletin 1997;36:72.
9. ABI PRISM™ DNA sequencing : Chemistry guides. Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA. 1995:1-3.
10. Sanguansermsri T, Utravichia J, Kunaviktikul C, et al. Prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis. J Ped Soc Thai 1990;29:34-41.
11. Ko TM, Tseng LH, Hsu PM. et al. Ultrasonographic scanning of placental thickness and the prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassaemia 1 in the second trimester. Prenat Diagn 1995;15:7-10.
12. Kanokpongsakdi S, Fucharoen S, Vatanasiri C. et al. Ultrasonographic method for detection of haemoglobin Bart's hydrops fetalis in the second trimester of pregnancy. Prenat Diagn 1990;10:809-13.
13. Tongsong T, Wanapirak C, Sirivatanapa P, Sanguansermsri T, et al. Eradication of Hb Bart's Hydrops Fetalis by Prenatal Strategy. บทคัดย่อ Fourth National Conference On Thalassemia เชียงใหม่ 2-4 กันยายน 2541:FP4.
14. Torcharus K, Sriphaisal T, Krutvacho T, et al. Prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis by PCR technique: Premongkutklao experience. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995;26:287-90.
15. Winichagoon P, Fucharoen S, Kanokpongsakdi S, Fukumaki Y. Detection of α -thalassemia 1 (Southeast Asian type) and its application for prenatal diagnosis. Clin Genet 1995;47:318-20.
16. Chang JG, Lee LS, Lin CP, Chen PC. Rapid diagnosis of α -thalassemia 1 of Southeast Asian type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction. Blood 1991;78:853-4.
17. Bowden DK, Vickers MA, Higgs DR. A PCR-base strategy to detect the common severe determinants of α -thalassemia. Br J Haematol 1995;81:104-8.
18. Torcharus K, Ketpunya A, Sriphaisal T, et al. Prenatal Diagnosis of Homozygous Alpha-Thalassemia 1 of Southeast Asian Type by Polymerase Chain Reaction. Thai J Hematol Transf Med 1998;8:33-8.
19. Kor-anantakul O, Suwanrath C, Leetanapor R, et al. Prenatal Diagnosis of Thalassemia in Songklanagarind Hospital. บทคัดย่อ Fou ๓ National Conference On Thalassemia เชียงใหม่ 2-4 กันยายน 2541:SP10.
20. Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R, et al. Prenatal and postnatal diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. Clin Chem 1998; 44:740-8.
21. Chowthaworn J, Winichagoon P, Sripanich R, Sae-Ngow B, Kanokpongsakdi S, Fucharoen S. Prenatal diagnosis for thalassemia by the automated HPLC. บทคัดย่อ Fourth National Conference on Thalassemia เชียงใหม่ 2-4 กันยายน 2541:FP 9.

Prenatal Diagnosis of Homozygous α -Thalassemia 1 by Fetal Hemoglobin Typing with High Performance Liquid Chromatography

Sanguansermisri T, Steger HF, Chamrasratanakorn T, Chomchuen S, Tongsong T*, Sirivatanapa P*, and Chanprapas P*.

Department of Pediatrics, *Department of Obstetrics and Gynecology Faculty of Medicine Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Abstract: The current prenatal diagnostic method for homozygous α -thalassemia 1 (Hb Bart's hydrops fetalis) is to analyze the DNA obtained from chorionic villi sampling. Although it is a high precision method and can be used for prenatal diagnosis in the 8th - 12th week gestation period, the procedure is rather complicated and errors due to contamination of the mother's tissue may occur. The analysis of Hb type for example Hb F and Hb A which are not found in fetus with Hb Bart's hydrops fetalis is an alternative to prenatal diagnostic method. **Method:** The blood of 18-22 weeks fetuses were obtained from cordocentesis in 32 antenatal women suspected of having homozygous α -thalassemia 1. They were analyzed by PCR - based method of α -thalassemia 1 (SEA type) and the Hb proportion were determined by automated HPLC. **Results:** Eight out of 32 cases were reported to be homozygous α -thalassemia 1, 14 were α -thalassemia 1 trait, 3 were Hb E/ α -thalassemia 1 and no α -thalassemia 1 gene was found in 7 cases. The fetal Hb typing for homozygous α -thalassemia 1 chromatogram showed unbound Hb (Hb Bart's and Hb Portland) peak without Hb F, Hb A and Hb A₂. The α -thalassemia 1 trait chromatogram showed unbound Hb, pre Hb F, Hb F and Hb A peaks. The normal fetus chromatogram showed Hb F and Hb A peaks without Hb A₂. The Hb A proportion is between 4-7% and unchanged during the 18-22 week gestation period. The analysis of Hb types by HPLC is convenient and speedy, and the results correspond with the PCR α -thalassemia 1 method. **Discussion and Summary:** Fetal Hb typing by automated HPLC is a prenatal diagnostic method for homozygous α -thalassemia 1. As it is precise and simple, it is therefore suitable for the diagnosis of antenatal women suspected of having homozygous α -thalassemia 1 and should be used in thalassemia prevention and care projects of Thailand.

Key Words : ● PND ● Homozygous α -thalassemia 1 ● Fetal Hb typing ● HPLC

Thai J Hematol Transf Med 1999;9:283-92.