

การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติกับการชะล้างออกจากแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้า

สุทธิพรธรรม กิจเจริญ^{1,2} วุฒิชัย สุขสนธิ^{3,4} ธัญวรรณ์ ปิยะพงษ์กุล³ ยศสมบัติ จังตระกูล⁴
กนกวรรณ แสนไชยสุริยา^{1,2} ณัฐยา แซ่ฮึ้ง^{1,2} กุลนภา พู่เจริญ^{1,2}

ปัจจุบันได้มีการนำเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติซึ่งใช้หลักการคอลัมน์โครมาโตกราฟีมาใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยมุ่งเน้นให้โปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลรายงานเฉพาะปริมาณของฮีโมโกลบินเอสอง (Hb A₂) และฮีโมโกลบินเอฟ (Hb F) จึงมีข้อจำกัดเหมือนกัน คือ ไม่รายงานปริมาณฮีโมโกลบินบาร์ทส์ (Hb Bart's) และฮีโมโกลบินเอช (Hb H) การศึกษาครั้งนี้จึงได้ปรับโปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลของเครื่อง Bio-Rad Variant™ hemoglobin testing system (modified β-thalassemia short; MBTS) เพื่อให้รายงานปริมาณ Hb Bart's และ Hb H เปรียบเทียบกับวิธี cellulose acetate electrophoresis and elution technique (CAE) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานจากตัวอย่างเลือดที่มี Hb Bart's และ Hb H จำนวน 41 ราย พบว่าทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์กันดี ($r = 0.94$) แต่ปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากวิธี elution technique เล็กน้อย โดยมีค่าเท่ากับ $15.08 \pm 9.89\%$ และ $13.06 \pm 7.70\%$ ตามลำดับ ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้แนะว่า สามารถนำระบบการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาใช้ตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ได้ จึงควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อการนำระบบการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินทดแทนระบบเดิม เนื่องจากปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดได้ จะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยอัลฟา-ธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ

คำรหัส : ฮีโมโกลบินบาร์ทส์ • ฮีโมโกลบินเอช • เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ

บทนำ

อัลฟา-ธาลัสซีเมียเป็นภาวะเลือดจางกรรมพันธุ์ที่พบทั่วโลก และพบได้ร้อยละ 20-30 ของคนไทย⁽¹⁻³⁾ อัลฟา-ธาลัสซีเมียเกิดจากการขาดหายไป (deletion) หรือการกลายพันธุ์ (mutation or non-deletion) ของยีนอัลฟา-โกลบินซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 ข้างละ 2 ยีน ในคนปกติจึงมียีนอัลฟา-โกลบินทั้งหมด 4 ยีน เมื่อยีน

อัลฟา-โกลบินมีความผิดปกติจะสังเคราะห์สายอัลฟา-โกลบินได้น้อยลง ส่งผลให้สายแกมมา-โกลบินและสายบีตา-โกลบินที่เหลืออยู่มารวมกันเอง 4 สาย เป็น Hb Bart's (γ₄) และ Hb H (β₄) ตามลำดับ ดังนั้นการตรวจพบ Hb Bart's และ Hb H จึงบ่งบอกถึงอัลฟา-ธาลัสซีเมีย⁽⁴⁾ และการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's จาก

¹ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์

³นักศึกษาศาสาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴หน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Comparative study of quantity of Hb Bart's and Hb H determined by automated hemoglobin analyzer and cellulose acetate electrophoretic elution technique

Suttiaphan Kitcharoen^{1,2}, Wuttichai Suksanit^{3,4}, Thanwarat Piyapongekul³, Yossombat Changtrakul⁴, Kanokwan Sanchaisuriya^{1,2}, Nattaya Sae-ung^{1,2}, Goonnapa Fucharoen^{1,2}

Abstract

At present automated hemoglobin (Hb) analyzers based on column chromatography have been used widely in Thailand. The Hb analyzing programs have been developed primarily for determination of Hb A₂ and Hb F leading to the limitation that they do not quantify Hb Bart's and Hb H. In this study we modified the β -thalassemia short (MBTS) program of the Bio-Rad VariantTM Hb testing system in order to facilitate quantification of Hb Bart's and Hb H comparing with standard method, cellulose acetate electrophoresis and elution technique (CAE). Forty one blood samples with Hb Bart's and Hb H were studied. The values of Hb Bart's and Hb H obtained from these two methods revealed an excellent correlation ($r = 0.94$). However, the quantity of Hb Bart's and Hb H obtained using MBTS program were slightly higher than those of CAE ($15.08 \pm 9.89\%$ and $13.06 \pm 7.70\%$, respectively). This result indicates that the MBTS program could be used for quantification of Hb Bart's and Hb H. Further study of the system is required before it can be introduced into a routine Hb analysis setting as Hb Bart's and Hb H levels are useful for diagnosis of α -thalassemia genotypes.

Key words : Hb Bart's • Hb H • automated hemoglobin analyzer

เลือดสายสะดือทารกในครรภ์ และทารกแรกคลอด จึงเป็นการทดสอบที่นิยมใช้ในการตรวจหาอัลฟา-ธาลัสซีเมียระยะก่อนคลอดและหลังคลอด ซึ่งปริมาณ Hb Bart's จะแตกต่างกันไปในแต่ละจีโนไทป์⁽⁵⁻¹⁰⁾ วิธีการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ทำได้หลายวิธี เช่น cellulose acetate electrophoresis and elution technique (CAE)^(11,12), immunological method⁽¹³⁻¹⁷⁾, microchromatography^(18,19), isoelectrofocusing (IEF)^(20,21) และ high performance liquid chromatography (HPLC)⁽²²⁻²⁵⁾ ในปัจจุบันเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน

อัตโนมัติได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้หลักการ HPLC และการแลกเปลี่ยนไอออนบวก (cation exchange HPLC) เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติที่ถูกพัฒนาขึ้นมานี้ มุ่งเน้นให้โปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลรายงานเฉพาะ ปริมาณ Hb A₂ และ Hb F จึงมีข้อจำกัดเหมือนกัน คือ ไม่สามารถรายงานปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ได้ เครื่อง Bio-Rad VariantTM hemoglobin testing system เป็นเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติที่ห้องปฏิบัติการต่างๆในประเทศไทยใช้กันอย่างแพร่หลาย เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัตินี้ใช้หลักการ cation

¹Department of Clinical Microscopy,

²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL),

³The 4th Year Medical Technology Student, Faculty of Associated Medical Sciences,

⁴Clinical Microscopy Unit, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

exchange HPLC มีโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผลที่ใช้โดยทั่วไป คือ β -thalassemia short (BTS) ซึ่งไม่รายงานปริมาณ Hb Bart's และ Hb H แต่มี peak ของ Hb Bart's และ Hb H ปรากฏให้เห็น การศึกษาครั้งนี้จึงได้ปรับโปรแกรม BTS (modified β -thalassemia short; MBTS) เพื่อให้รายงานปริมาณ Hb Bart's และ Hb H⁽²⁶⁾ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี CAE ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน⁽¹²⁾ ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการนำโปรแกรม MBTS มาใช้ในการตรวจประจำทดแทนโปรแกรม BTS

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างเลือด

ใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Bio-Rad VariantTM hemoglobin testing system จากหน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเลือกเฉพาะรายที่มี Hb Bart's และ Hb H จากตรวจยืนยันด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis จำนวน 41 รายการศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (รหัสโครงการ HE 480429)

การตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H

ตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ในตัวอย่างเลือดทุกรายด้วยวิธี CAE^(12,27) ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาเปรียบเทียบครั้งนี้ และนำตัวอย่างเลือดไปตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอีกครั้งด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Bio-Rad VariantTM hemoglobin testing system โดยปรับโปรแกรม BTS ให้เริ่มวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ตั้งแต่ retention time (RT) 0.01 นาที (MBTS) จากเดิมซึ่งเครื่องจะเริ่มวิเคราะห์ผลตั้งแต่ช่วง RT ของ Hb F คือ ประมาณ 0.7 นาที (BTS) การปรับโปรแกรมหวังจะทำให้เครื่องรายงานปริมาณ

Hb Bart's และ Hb H ด้วย⁽²⁶⁾

การเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MBTS ใช้วิธีเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BTS คือ ใช้เม็ดเลือดแดง 3.5 ไมโครลิตร ผสมกับ hemolysing reagent 1 มิลลิตร ปิดพาราฟิล์ม แล้วผสมให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ Vortex mixer นำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน

ผลการศึกษา

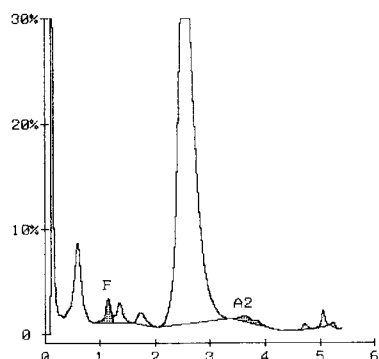
ผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง Bio-Rad VariantTM hemoglobin testing system แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนโครมาโตแกรม ที่แสดง peak ของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด และส่วนข้อมูลที่ประมวลผลโดยเครื่องและแสดงค่าปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดเป็นร้อยละ เมื่อปรับการวิเคราะห์ผลจากโปรแกรม BTS มาใช้โปรแกรม MBTS ส่วนโครมาโตแกรมที่ได้จากทั้งสองโปรแกรมจะไม่แตกต่างกัน คือ เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดรายเดียวกัน จะมี peak ของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ตรงกัน โดยเฉพาะตัวอย่างเลือดที่สดใหม่ (fresh blood) จะพบ peak ของ Hb Constant Spring (Con Sp) ได้ชัดเจนเหมือนกัน ดังแสดงใน **รูปที่ 1** ส่วนที่แตกต่างกันคือ ข้อมูลที่ได้จากการประมวลผลโดยเครื่อง โปรแกรม MBTS จะมีการรายงานปริมาณของ peak ที่ถูกชะออกมาก่อน Hb F (RT น้อยกว่า 0.7 นาที) โดยรายงานเรียงจาก RT ที่น้อยที่สุด เป็น unknown 1, unknown 2 และบางรายอาจมี unknown 3 ด้วย โดย peak ที่รายงานเป็น Hb Bart's คือ unknown 1 (RT ประมาณ 0.12 นาที) และ Hb H คือ unknown 2 หรือ unknown 3 โดยพิจารณาจากค่า RT ประมาณ 0.58 นาที⁽²⁶⁾ และปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่ถูกชะออกมาตั้งแต่ช่วง RT ≥ 0.7 นาที ได้แก่ Hb F, Hb A (A₀) และ Hb A₂ อาจไม่เท่ากัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BTS และ MBTS ดังตัวอย่างที่แสดงใน **รูปที่ 1**

TECH ID# 0
VIAL# 38
SAMPLE ID# 00000000000000000521

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	1.9	1.14	31683
P2	1.9	1.35	31519
P3	1.4	1.73	23817
Ao	92.2	2.53	1552951
A2	1.8	3.61	25773
C-WINDOW	0.9	5.04	14367

TOTAL AREA 1680110

F 1.9% A2 1.8%

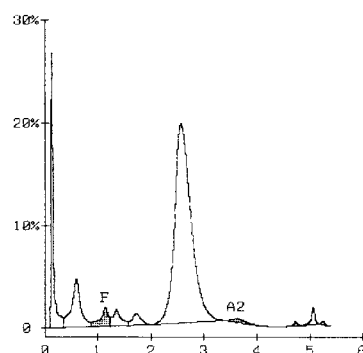


TECH ID# 0
VIAL# 19
SAMPLE ID# 000000000000000025480521

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
Unknown 1	12.0	0.13	264281
Unknown 2	9.4	0.60	206629
F	3.1	1.14	70936
P2	2.8	1.34	62432
P3	2.2	1.72	47638
Ao	68.2	2.56	1501006
A2	1.0	3.62	19001
C-WINDOW	1.2	5.05	26767

TOTAL AREA 2198676

F 3.1% A2 1.0%



รูปที่ 1 ตัวอย่างผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง Bio-Rad Variant™ hemoglobin testing system โปรแกรม β -thalassemia short (A) และ modified β -thalassemia short (B)

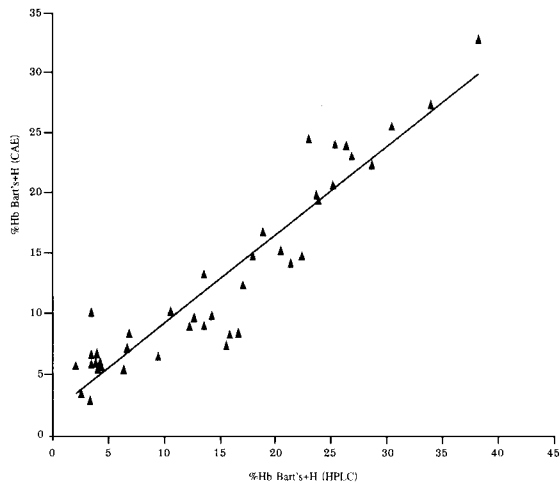
การศึกษาค้นพบว่า เมื่อนำโปรแกรม MBTS มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ในตัวอย่างเลือดที่มี Hb Bart's และ Hb H จำนวน 41 ราย พบว่า Hb Bart's (unknown 1) ถูกชะออกมาในช่วง RT 0.12 - 0.16 นาที และ Hb H (unknown 2 หรือ unknown 3) มีค่า RT อยู่ในช่วง 0.54 - 0.62 นาที ปริมาณ Hb Bart's (unknown 1) ที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วงร้อยละ 2.1 - 38.3 และปริมาณ Hb H (unknown 2 หรือ unknown 3) อยู่ในช่วงร้อยละ 3.9 - 26.1 (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ Hb Bart's และ Hb H จากการตรวจวัดด้วยโปรแกรม MBTS กับวิธี CAE ในตัวอย่างเลือดที่มี Hb Bart's และ Hb H จำนวน 41 ราย พบว่าปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย 2 วิธี มีความสัมพันธ์กันดี (correlation coefficient; $r = 0.94$) ดังแสดงใน รูปที่ 2 Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติโปรแกรม MBTS มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากวิธี CAE โดยมีค่าเฉลี่ย

เท่ากับ $15.08 \pm 9.89\%$ และ $13.06 \pm 7.70\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อทดสอบสถิติโดยใช้ paired t-test พบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากทั้ง 2 วิธี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.0008$)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Bio-Rad Variant™ hemoglobin testing system ตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยใช้หลักการ cation exchange HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) ความถูกต้อง (accuracy) ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำในการตรวจวัดซ้ำ (reproducibility) ดีมาก⁽²⁸⁻³⁰⁾ เมื่อใช้โปรแกรม BTS ในการวิเคราะห์ผล จะรายงานปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดตั้งแต่ช่วง RT ของ Hb F ที่ประมาณ 0.7 นาที โดยจะรายงานปริมาณฮีโมโกลบินที่พบในผู้ใหญ่ปกติเสมอ คือ Hb A, Hb A₂ และ Hb F นอกจากนี้ยังรายงานฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นๆ ได้แก่ Hb S, D, C และ E ซึ่ง Hb E นั้น ไม่สามารถแยกออกจาก Hb A₂ ได้



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดด้วยวิธีเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Bio-Rad Variant™ hemoglobin testing system โดยใช้โปรแกรม modified β -thalassemia short (HPLC) และวิธี cellulose acetate electrophoresis and elution technique (CAE)

จะรายงานรวมอยู่กับ Hb A₂ ผู้ใช้ต้องทราบหลักเกณฑ์ในการรายงานผล โดยทั่วไปถือเกณฑ์ว่า เป็น Hb E เมื่อมีปริมาณ Hb A₂ ตั้งแต่ร้อยละ 10 ขึ้นไป จากการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่า เมื่อปรับมาใช้โปรแกรม MBTS ซึ่งเริ่มวิเคราะห์ผลตั้งแต่ RT 0.01 นาที ลักษณะโครมาโตแกรมที่ได้ไม่แตกต่างจากโปรแกรม BTS (ดังตัวอย่างในรูปที่ 1) กล่าวคือ ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะถูกชะออกมาในช่วง RT เดียวกับโปรแกรม BTS เนื่องจากไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบบัฟเฟอร์ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยโปรแกรม MBTS จึงควรให้ผลในการตรวจชนิดฮีโมโกลบินได้เทียบเท่ากับการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BTS ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงไว้เสมอว่า ปัญหาและข้อจำกัดที่พบในการแปลผลลักษณะโครมาโตแกรมที่ได้จากโปรแกรม BTS ก็พบได้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MBTS เช่นเดียวกัน ซึ่งปัญหาและข้อจำกัดที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการนำโปรแกรม MBTS ไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ได้แก่ ตัวอย่างเลือดที่มีพลาสมา

สีเหลืองเข้ม จะพบมี peak ในตำแหน่งของ Hb Bart's ความสดใหม่ของตัวอย่างเลือดที่มีผลต่อการตรวจฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร เช่น Hb Constant Spring และในตัวอย่างเลือดทารกแรกคลอดที่มีปริมาณ Hb F สูง จะพบว่ามี acetylated Hb F ที่ตำแหน่งเดียวกับ Hb H หรือมีการยับยั้งของ peak Hb F ไปอยู่ที่ตำแหน่ง P2 ทำให้เข้าใจผิดว่าเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ⁽³¹⁾

การรายงานปริมาณฮีโมโกลบินที่ได้จากตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MBTS นั้น แตกต่างจากโปรแกรม BTS โดยจะรายงานปริมาณฮีโมโกลบินที่ถูกชะออกมาตั้งแต่ RT 0.01 นาที รวมถึง Hb Bart's (unknown 1) และ Hb H (unknown 2 หรือ unknown 3) ด้วย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า Hb Bart's มีค่า RT อยู่ในช่วง 0.12 - 0.16 นาที และ Hb H มีค่า RT อยู่ในช่วง 0.54 - 0.62 นาที ซึ่งเป็นค่า RT ช่วงเดียวกับที่ Papassotiriou และคณะรายงานไว้⁽²⁶⁾ ผลจากการที่โปรแกรม MBTS รายงานปริมาณฮีโมโกลบินตั้งแต่ RT 0.01 นาที ทำให้ปริมาณฮีโมโกลบินหลัก 3 ชนิด คือ Hb A, Hb A₂ และ Hb F แตกต่างจากปริมาณที่รายงานโดยโปรแกรม BTS โดยเฉพาะเมื่อตัวอย่างเลือดมี Hb Bart's และ Hb H (ตัวอย่างในรูปที่ 1) เนื่องจากโปรแกรมคำนวณปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่ปรากฏในโครมาโตแกรมเป็นค่าร้อยละจากพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ peak เทียบกับพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด (ฮีโมโกลบินทั้งหมด) ดังนั้นหากต้องการนำโปรแกรม MBTS มาใช้ในการตรวจประจำ จึงควรมีการศึกษาถึงผลกระทบต่อปริมาณ Hb A₂ และ Hb F ซึ่งมีความสำคัญในการใช้วินิจฉัยปีตา-ธาลัสซีเมีย

เมื่อนำโปรแกรม MBTS มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ในตัวอย่างเลือดที่มี Hb Bart's และ Hb H จำนวน 41 ราย เปรียบเทียบกับวิธี CAE พบว่าทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์กันดี ($r = 0.94$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Papassotiriou และคณะ⁽²⁶⁾ ซึ่งทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Bio-Rad Variant™ hemoglobin testing system โดยใช้โปรแกรม MBTS กับวิธี IEF ได้ค่า $r = 0.97$

ตารางที่ 1 ปริมาณ (%) Hb Bart's และ Hb H ที่ได้จากการตรวจวัดด้วยวิธีเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ (Bio-Rad Variant with modified β -thalassemia short program) และวิธี elution technique โดยแสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD (range)

Hb Types	จำนวน (ราย.)	HPLC (modified β -thalassemia short)			Elution technique
		Hb Bart's (%) (range)	Hb H (%) (range)	Hb Bart's + Hb H (%) (range)	Hb Bart's + Hb H (%) (range)
1. กลุ่มตัวอย่างที่มี Hb Bart's + Hb H					
- ConSpA ₂ ABart'sH	15	8.55 $\pm$ 2.53 (4.5-12.0)	15.79 $\pm$ 4.58 (9.4-26.1)	24.23 $\pm$ 4.97 (14.3-34.0)	19.96 $\pm$ 5.16 (10.01-27.51)
- A ₂ ABart'sH	8	4.16 $\pm$ 1.35 (2.1-5.9)	7.06 $\pm$ 2.72 (3.9-12.2)	11.23 $\pm$ 3.82 (6.4-18.0)	9.14 $\pm$ 2.86 (5.6-14.94)
	23	7.02 $\pm$ 3.03 (2.1-12.0)	12.76 $\pm$ 5.81 (3.9-26.1)	19.71 $\pm$ 7.77 (6.4-34.0)	16.20 $\pm$ 6.97 (5.6-27.51)
2. กลุ่มตัวอย่างที่มี เฉพาะ Hb Bart's					
- ConSpEABart's	6	3.87 $\pm$ 0.35 (3.4-4.3)	-	3.87 $\pm$ 0.35 (3.4-4.3)	5.67 $\pm$ 1.35 (3.05-6.95)
- (ConSp) A ₂ ABart's	1	3.5	-	3.5	10.27
- ConSpFABart's	1	38.3	-	38.3	32.94
- ConSpFABart's	1	18.9	-	18.9	16.97
- A ₂ (E)FABart's	2	16.7, 15.9	-	16.7, 15.9	8.59, 8.47
- A ₂ (E)FBart's	1	2.6	-	2.6	3.57
- A ₂ (F)A(Bart's)	1	6.9	-	6.9	8.55
- ConSpA ₂ FABart's	1	4.4	-	4.4	5.85
- EE(F)Bart's	1	2.1	-	2.1	5.9
- ConSpEFABart's	1	13.6	-	13.6	13.5
- FABart's	1	15.6	-	15.6	7.6
- EFABart's	1	3.5	-	3.5	6.8
	18	9.18 $\pm$ 9.27 (2.1-38.0)	-	9.18 $\pm$ 9.27 (2.1-38.0)	9.06 $\pm$ 6.82 (3.05-32.94)
Total	41	7.97 $\pm$ 6.54 (2.1-38.3)	12.76 $\pm$ 5.81 (3.9-26.1)	15.08 $\pm$ 9.89 (2.1-38.3)	13.06 $\pm$ 7.70^a (3.05-32.94)

a : เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย paired t-test มีค่า p-value = 0.0008

แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดด้วยโปรแกรม MBTS มีค่าสูงกว่าวิธี CAE โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 15.12 ± 9.92 % และ 13.02 ± 7.64 ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่างที่พบนี้ ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากเทคนิคการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ด้วยวิธี CAE ซึ่งเป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอน ขั้นตอนที่สำคัญ คือ การชะฮีโมโกลบินออกจากแผ่นเซลลูโลส อะซีเตท ในขั้นตอนนี้อาจมีฮีโมโกลบินบางส่วน ไม่สามารถชะออกมาได้อย่างสมบูรณ์ และอาจเป็นสาเหตุ ที่ทำให้ปริมาณฮีโมโกลบินที่ตรวจวัดโดยวิธี CAE นี้ ต่ำกว่าวิธี MBTS

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ในการนำโปรแกรม MBTS มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H แทนวิธี CAE ได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Papassotiriou และคณะ⁽²⁶⁾ พบว่า การตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ด้วยโปรแกรม MBTS มีความแม่นยำในการตรวจวัดซ้ำดีมาก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; CV) ไม่เกินร้อยละ 3.0 นอกจากนี้การใช้โปรแกรม MBTS ในการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ยังมีข้อดีเหนือกว่าโปรแกรม α -thalassemia short (ATS) ซึ่งเป็นโปรแกรมจำเพาะสำหรับการวินิจฉัยอัลฟา-ธาลัสซีเมีย คือ ไม่จำเป็นต้องใช้โปรแกรมและชุดน้ำยาพิเศษที่มีราคาแพง และโปรแกรม MBTS สามารถตรวจวัดปริมาณ Hb H ได้ ในขณะที่โปรแกรม ATS ไม่สามารถตรวจ Hb H ได้⁽²⁶⁾ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาอ้างอิงของปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MBTS ในอัลฟา-ธาลัสซีเมียจีโนไทป์ต่างๆ ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการนำปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดด้วยวิธีนี้ไปใช้สำหรับช่วยวินิจฉัยและบ่งบอกจีโนไทป์ของอัลฟา-ธาลัสซีเมียในทารกแรกคลอด ส่วนการจะนำโปรแกรม MBTS มาใช้แทน BTS ในงานประจำวันกับตัวอย่างเลือดทั่วไปนั้น ควรมีการศึกษาถึงผลกระทบต่อค่า cut off ของปริมาณฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะ HbA₂, Hb E และ Hb F ต่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ก่อน

เอกสารอ้างอิง

1. Winichagoon P, Higgs DR, Goodbourn SE, Clegg JB, Weatherall DJ, Wasi P. The molecular basis of alpha-thalassaemia in Thailand. *EMBO J.* 1984;3:1813-8.
2. Winichagoon P, Thonglairuam V, Fucharoen S, Tanphaichito VS, Wasi P. Alpha-thalassemia in Thailand. *Hemoglobin.* 1988;12: 485-98.
3. Winichagoon P, Fucharoen S, Wasi P. The molecular basis of alpha-thalassemia in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1992;23 Suppl 2:7-13.
4. Bernini LF, Hartevelde CL. Alpha-thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol.* 1998;1:53-90.
5. Lie-Injo LE, Solai A, Herrera AR, Nicolaisen L, Kan YW, Wan WP, et al. Hb Bart's level in cord blood and deletions of alpha-globin genes. *Blood.* 1982;59:370-6.
6. Tanphaichitr VS, Pung-amritt P, Puchaiwatanonoon O, Winichagoon P, Fucharoen S, Suvatte V, et al. Studies of hemoglobin Bart's and deletion of α -globin genes from cord blood in Thailand. *Birth Defects.* 1988;23:15-21.
7. Zhao W, Zhang J, Wang NS, Deng P. The relationship between Hb Bart's levels in cord blood and the deletions of alpha-globin genes. *Hemoglobin.* 1988;12:519-27.
8. Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R, Sae-Ngow B, Sriphanich R, Oncoung W, et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clin Chem.* 1998;44:740-8.
9. Kyriacou K, Kyri A, Kalogirou E, Vasiliades P, Angastiniotis M, Ioannou PA, et al. Hb Bart's levels in cord blood and alpha-thalassemia mutations in Cyprus. *Hemoglobin.* 2000; 24:171-80.
10. Rugless MJ, Fisher CA, Stephens AD, Amos RJ, Mohammed T, Old JM. Hb Bart's in cord blood: an accurate indicator of alpha-

- thalassemia. Hemoglobin. 2006;30:57-62.
11. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate. J Clin Pathol. 1965;18:790-2.
 12. International Committee for Standardization in Hematology. Recommendations for selected methods for quantitative estimation of Hb A₂ and for Hb A₂ reference preparation. Br J Haematol. 1978;38:573-8.
 13. Wasi P, Pravatmuang P, Winichagoon P. Immunologic diagnosis of alpha-thalassemia traits. Hemoglobin 1979;3:21-31.
 14. Garver FA, Singh H, Moscoso H, Kestler DP, McGuire BS, Jr. Identification and quantification of hemoglobins A₂ and Bart's with an enzyme-labeled immunosorbent assay. Clin Chem 1984;30:1205-8.
 15. Luo HY, Clarke BJ, Gauldie J, Patterson M, Liao SK, Chui DH. A novel monoclonal antibody based diagnostic test for alpha-thalassemia-1 carriers due to the (-SEA/) deletion. Blood 1988;72:1589-94.
 16. Shyamala M, Kiefer CR, Moscoso H, Garver FA. A monoclonal antibody-linked immunoassay for hemoglobin H disease. Ann Hematol 1992;65:37-40.
 17. Makonkawkeyoon L, Ongchai S, Sanguansermisri T. Determination of hemoglobin Bart's in alpha thalassemia traits by two-site immunoradiometric assay. II. Detection of hemoglobin Bart's in alpha thalassemia traits. J Med Assoc Thai 1992;75:565-9.
 18. Efremov GD, Huisman THJ. The laboratory diagnosis of the hemoglobinopathies. Clin Haematol 1974;3:527-42.
 19. Henson JB, Carver JR, Wilson JB, Huisman TH. Carboxymethyl-cellulose microchromatography for the quantitation of hemoglobin Bart's (gamma 4) and its use in the detection of the alpha-thalassemia conditions. J Chromatogr 1980;198:443-8.
 20. Black J. Isoelectric focusing in agarose gel for detection and identification of hemoglobin variants. Hemoglobin 1984;8:117-27.
 21. Kutlar A, Ozcan O, Brisco JT, Ansley MC, Huisman THJ. The detection of hemoglobin variants by isoelectrofocusing using EDTA-collected and filter paper-dried cord blood specimens. Am J Clin Pathol 1990;94:199-202.
 22. Gupta SP, Hanash SM. Separation of hemoglobin types by cation-exchange high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1983;134:117-21.
 23. Kutlar F, Fei YJ, Wilson JB, Kutlar A, Huisman TH. Detection of the embryonic zeta chain in blood from newborn babies by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1987; 394: 333-43.
 24. Kutlar F, Gu LH, Hu H, Huisman TH. Quantitation of hemoglobins Bart's, H, Portland-I, Portland-II and constant spring by anion-exchange high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1989; 487: 265-74.
 25. Van der Dijs FP vdBG, Schermer JG, Muskiet FD, Landman H, Muskiet FA. Screening cord blood for hemoglobinopathies and thalassemia by HPLC. Clin Chem 1992;38:1864-9.
 26. Papassotiriou I, Traeger-Synodinos J, Vlachou C, Karagiorga M, Metaxotou A, Kanavakis E, et al. Rapid and accurate quantitation of Hb Bart's and Hb H using weak cation exchange high performance liquid chromatography: correlation with the alpha-thalassemia genotype. Hemoglobin 1999; 23: 203-11.
 27. กุลนภา พู่เจริญ. การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบิน ด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า. ใน: กุลนภา พู่เจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา บรรณาธิการ. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น:โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2546: 57-60.

28. Lorey F CG, Shafer F, Lubin B, Vichinsky E. Universal screening for hemoglobinopathies using high-performance liquid chromatography: clinical results of 2.2 million screens. *Eur J Hum Genet* 1994;2:262-71.
29. Tan GB AT, Dunstan RA, Lee SH. Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobins A₂ and F. *J Clin Pathol* 1993;46:852-6.
30. Rogers BB WR, Ou CN, Buffone GJ. High-performance liquid chromatography in the diagnosis of hemoglobinopathies and thalassemias. Report of three cases. *Am J Clin Pathol* 1985;84:671-4.
31. กนกวรรณ แสนไชยสุริยา. การตรวจแยกชนิดและการตรวจปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ. ใน: กุลนภา พุเจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา บรรณาธิการ. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น:โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2546: 71-93.