

ปริมาณฮีโมโกลบินบาร์ทส์และฮีโมโกลบินอีในตัวอย่างเลือดสายสะดือทารกแรกคลอด: ผลการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่อง

จาวรอน ไตรทิพย์สมบัติ^{1,2} กนกวรรณ แสนไชยสุริยา^{2*} กุลนภา พุเจริญ² สุพรรณ พุเจริญ²
นิรุติ ศิริรัตนมานะวงศ์³ ชาญชัย พิลเมืองงาม³ ยศสมบัติ จังตระกูล⁴ ภัทร แสนไชยสุริยา⁵

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจแยกชนิดและตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินอย่างแพร่หลาย ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินและตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินบาร์ทส์ (Hb Bart's) และฮีโมโกลบินอี (Hb E) จากการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่อง ในตัวอย่างเลือดสายสะดือทารกแรกคลอดที่สงสัยว่าน่าจะมี Hb Bart's หรือ Hb E จากการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Primus CLC 330 (Primus Corp., MO, USA.) จำนวน 179 ราย และนำไปตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินซ้ำอีกครั้งด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Variant Hemoglobin Testing System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA.) ที่ได้ปรับโปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลให้วิเคราะห์ปริมาณ Hb Bart's ด้วย ตัวอย่างเลือดทุกรายได้รับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจหายีน α -thalassemia 1 (SEA และ THAI deletion) α -thalassemia 2 (3.7 และ 4.2 kb deletion), Hb Constant Spring (Hb CS) และ Hb Paksé รวมทั้ง Hb E เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างในภาพรวมของผลการตรวจวัดระหว่าง 2 เครื่อง โดยคำนวณค่าผลต่างของการตรวจวัด (difference; ค่าจากเครื่อง Primus - ค่าจากเครื่อง Variant) พบว่า ค่ามัธยฐาน (95% confidence interval) ของค่าความแตกต่างของปริมาณ Hb Bart's มีค่าเท่ากับ - 0.2 (-0.3, -0.1) และ ของปริมาณ Hb E มีค่าเท่ากับ - 0.15 (-0.3, -0.05) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb E ทั้ง 2 เครื่องแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wilcoxon sign rank sum test; $P < 0.001$ สำหรับ Hb Bart's และ $P = 0.008$ สำหรับ Hb E) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ Hb Bart's และ Hb E จำแนกตามจีโนไทป์ของธาลัสซีเมียที่ตรวจพบ พบว่า ค่าเฉลี่ยปริมาณ Hb Bart's และ Hb E ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus มีแนวโน้มที่ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Variant ในเกือบทุกจีโนไทป์ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณ Hb Bart's ในแต่ละจีโนไทป์ พบว่า จีโนไทป์ที่มีค่าเฉลี่ยของการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's แตกต่างกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ คือ กลุ่มที่เป็นพาหะ α -thalassemia 1 โดยพบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus และเครื่อง Variant เท่ากับ $11.7 \pm 2.0 \%$ และ $12.1 \pm 2.5 \%$ ตามลำดับ ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าผลการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's อาจนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองพาหะ α - thalassemia 1 ในทารกแรกคลอดได้ไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ : ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินบาร์ทส์ ฮีโมโกลบินอี เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ ทารกแรกคลอด

¹ บัณฑิตวิทยาลัย ² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ ศูนย์อนามัยที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์

⁴ หน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์

⁵ ภาควิชาโภชนวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Hb Bart's and Hb E in cord blood : analysis using two automated Hb analyzers

Jaruwan Tritipsombut^{1,2}, Kanokwan Sanchaisuriya^{2*}, Goonnapa Fucharoen², Supan Fucharoen², Nirut Siriratmanawong³, Charnchai Pinmuang-ngam³, Yossombat Changtrakul⁴, Pattara Sanchaisuriya⁵

Abstract

At present, an automated hemoglobin (Hb) analyzer has been used widely for determining the Hb profiles. The aim of this study was to compare Hb Bart's and Hb E levels obtained from the 2 different automated-HPLC-analyzers. One hundred and seventy-nine cord blood samples suspected of having Hb Bart's and Hb E determined by the Primus CLC 330 (Primus Corp, MO, USA.) were recruited. These samples were analyzed again by the Variant Hemoglobin Testing System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA.) in which the data processor was modified to quantify the amount of Hb Bart's. All samples were investigated for α -thalassemia 1 (SEA and THAI deletions), α -thalassemia 2 (3.7 and 4.2 kb deletions), Hb Constant Spring (Hb CS) and Hb Paksé as well as Hb E genes. Analysis of the difference-values of Hb Bart's and Hb E levels obtained from the 2 systems revealed a median (95% CI) of -0.2 (-0.3, -0.1) for Hb Bart's and -0.15 (-0.3, -0.05) for Hb E indicating that these values were significantly different ($P < 0.001$ for Hb Bart's and $P = 0.008$ for Hb E; Wilcoxon sign rank test). Comparison of Hb Bart's and Hb E levels according to the thalassemia genotypes showed a lower trend of the values obtained from the Primus in almost all genotypes. However, statistical analysis of Hb Bart's in a group of α -thalassemia 1 newborns showed no significant difference ($11.7 \pm 2.0\%$ vs $12.1 \pm 2.5\%$). The results indicated that Hb Bart's level obtained from these 2 systems might be used comparatively for screening of α -thalassemia 1 in newborns.

Keywords : Thalassemia, Hemoglobin Bart's, Hemoglobin E, Automated hemoglobin analyzer, Newborn

บทนำ

Hb Bart's เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการรวมกันของสายแอมมาโกลบิน 4 สาย (γ_4) ซึ่งพบในผู้ป่วยโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย และในทารกแรกคลอดทั้งที่เป็นพาหะและโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย⁽¹⁾ จากการศึกษาที่

ผ่านมา พบว่า ปริมาณ Hb Bart's ในทารกแรกคลอดจะสัมพันธ์กับจีโนไทป์ของอัลฟาธาลัสซีเมีย⁽²⁻⁶⁾ ดังนั้น ปริมาณ Hb Bart's จึงสามารถนำไปใช้ในการทำนายจีโนไทป์ของอัลฟาธาลัสซีเมียในทารกแรกคลอดได้

¹ The Graduate School, ²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University,

³ Regional Health Center 8, Nakhon Sawan province,

⁴ Microscopy Diagnostic unit, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine,

⁵ Department of Nutrition, Faculty of Public Health, Khon Kaen University

* Corresponding author (e-mail: kanokwan@kku.ac.th)

Hb E เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่งที่หากไม่ปฏิบัติสัมพันธ์กับปีศาจลัสซีเมีย ก็อาจส่งผลให้มีอาการแสดงของโรคธาลัสซีเมียที่รุนแรงได้ Hb E เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินในตำแหน่งโคดอนที่ 26 ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนสายบีตาโกลบินจากกรดกลูตามิกไปเป็นโลซีน ได้เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่ไม่เสถียรและมีประจุสุทธิเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม สำหรับในผู้ใหญ่ที่เป็นพาหะ Hb E จะตรวจพบในปริมาณ Hb E ได้ในช่วงร้อยละ 25-35 ของปริมาณฮีโมโกลบินรวม แต่ในทารกแรกคลอดนั้น กลไกการทำงานของยีนบีตาโกลบินยังทำหน้าที่ได้ไม่สมบูรณ์ ในกรณีได้รับการถ่ายทอดยีน Hb E มา ก็จะตรวจพบได้ในปริมาณที่น้อยกว่าร้อยละ 10 โดยจากการศึกษาปริมาณ Hb E ในทารกแรกคลอดที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี โดยตรวจวัดด้วยวิธี microcolumn chromatography พบประมาณร้อยละ 3 ในทารกที่เป็น heterozygote และพบประมาณร้อยละ 8 ในทารกที่เป็น homozygote⁽⁷⁾

Hb Bart's และ Hb E สามารถตรวจพบได้โดยการแยกชนิดด้วยกระแสไฟฟ้า และตรวจวัดปริมาณได้ด้วยวิธี microcolumn chromatography หรือ cellulose acetate electrophoresis and elution technique ในปัจจุบัน นิยมตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ ซึ่งมีข้อดี คือ สามารถตรวจแยกชนิดและตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดไปพร้อมกัน อีกทั้งมีความไวและความแม่นยำสูง อย่างไรก็ตาม เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติที่มีจำหน่ายแต่ละยี่ห้อ นั้น ถึงแม้จะใช้หลักการพื้นฐานเดียวกัน แต่โปรแกรมการวิเคราะห์อาจจะแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้ค่าที่ตรวจวัดได้จากแต่ละเครื่องแตกต่างกันได้ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินจากเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่อง โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณ Hb Bart's และ Hb E ในตัวอย่างเลือดสายสะดือทารกแรกคลอด รวมทั้งเปรียบเทียบการนำไปใช้ในการทำนายจีโนไทป์ของอัลฟาธาลัสซีเมียและพาหะฮีโมโกลบินอี

วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างเลือด

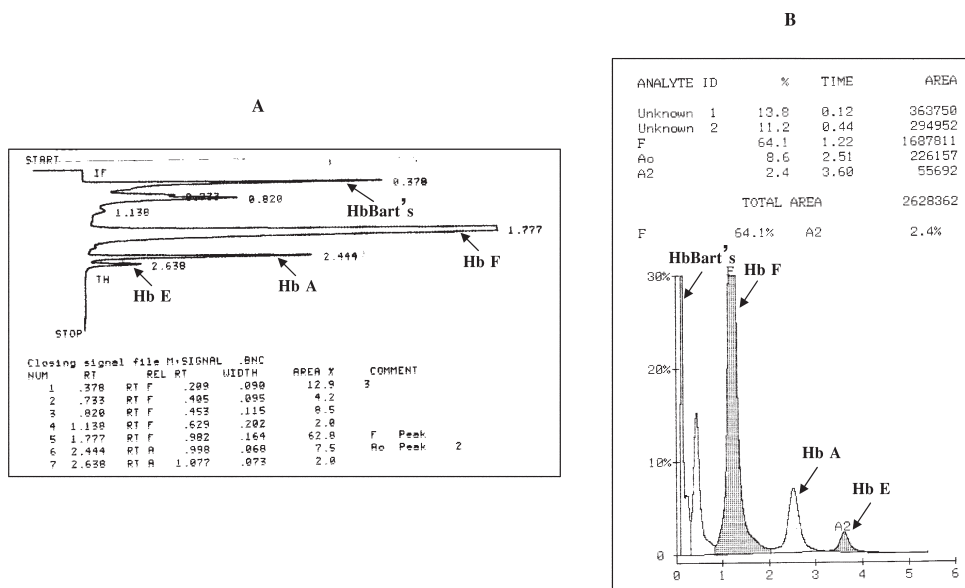
เป็นตัวอย่างเลือดสายสะดือทารกแรกคลอดที่มารดามารดา ณ ศูนย์อนามัยที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ ระหว่างเดือนธันวาคม 2549 ถึงเดือนเมษายน 2550 โดยได้รับคำยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากบิดาและมารดาของทารกแรกคลอด โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้ว (รหัสโครงการ HE490912)

วิธีการศึกษา

1. การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน

ตัวอย่างเลือดทุกรายที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน ได้รับการคัดเลือกจากตัวอย่างเลือดสายสะดือทารกแรกคลอดที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Primus CLC 330 (Primus Corp., MO, USA.) โดยคัดเลือกเอาตัวอย่างเลือดที่สงสัยว่าจะมี Hb Bart's โดยตรวจพบ peak ที่ถูกชะออกมาที่ relative retention time to Hb F (REL RT/F) อยู่ในช่วง 0.2 - 0.3 นาที และมีปริมาณมากกว่าร้อยละ 1 และ/หรือตัวอย่างที่สงสัยว่าจะมี Hb E โดยตรวจพบ peak ที่ถูกชะออกมาที่ REL RT/A อยู่ในช่วง 1.07 - 1.16 นาที และมีปริมาณมากกว่าร้อยละ 1

ตัวอย่างเลือดที่ได้รับการคัดเลือกตามเกณฑ์ จะถูกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Variant Hemoglobin Testing System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA.) ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Primus โดยมีการปรับโปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูล (modified β -thalassemia short program; MBTS)^(6,8-9) ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Hb Bart's ได้ ตัวอย่างโครมาโตแกรมแสดงผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินจากเครื่องอัตโนมัติทั้ง 2 เครื่อง แสดงไว้ใน รูปที่ 1



รูปที่ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Primus (A) และ Variant (B)

2. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดทุกรายจะถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหายีน α -thalassemia 1 (SEA and THAI deletion)^(10, 11), α -thalassemia 2 (3.7 and 4.2 kb deletion)⁽¹²⁾ Hb Constant Spring (Hb CS) และ Hb Pakse^(13, 14) และ Hb E⁽¹⁵⁾ รวมทั้งตรวจสอบ zygosity ในตัวอย่างเลือดทุกรายที่ตรวจพบยีน α -thalassemia 2 (3.7 and 4.2 kb deletion), Hb Constant Spring (Hb CS), Hb Pakse และ Hb E

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบภาพรวมของผลการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่อง โดยแสดงค่าการกระจายของข้อมูลจริง และแสดงค่าการกระจายของค่าความแตกต่างระหว่าง 2 เครื่องด้วยกราฟวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของปริมาณ Hb Bart's และ Hb E จากการตรวจวัดจากทั้ง 2 เครื่อง โดยใช้สถิติ Wilcoxon signed rank sum test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าการตรวจวัดที่ได้จาก 2 เครื่องจำแนกตามจีโนไทป์ของธาลัสซีเมียที่ตรวจพบ

ด้วยสถิติ paired t-test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P-value < 0.05

ผลการศึกษา

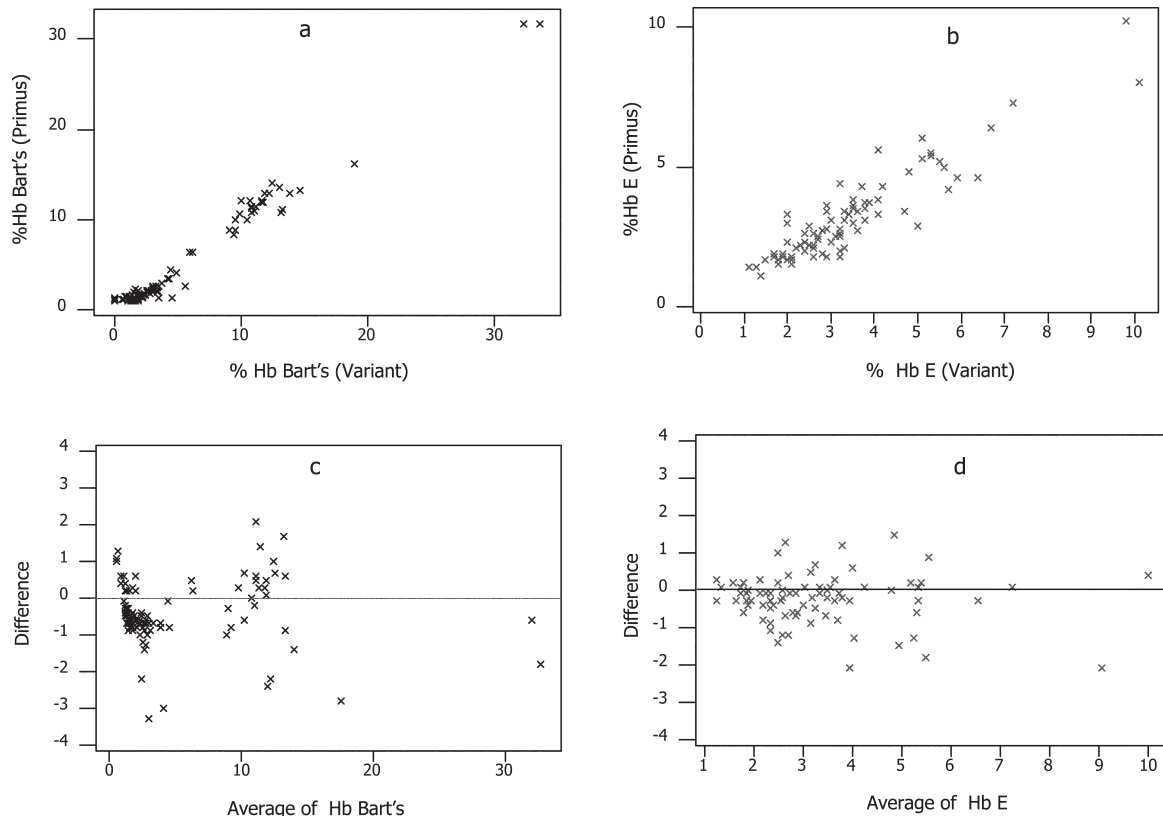
ผลการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb E ด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่อง

จากเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สงสัยว่ามี Hb Bart's ได้จำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 113 ราย และ กลุ่มที่สงสัยว่ามี Hb E ได้จำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 85 ราย การกระจายของค่าการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb E ในตัวอย่างเลือดสายสะดือทารกแรกคลอดทั้ง 2 กลุ่ม จากการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่อง แสดงไว้ใน **รูปที่ 2a** และ **2b** ซึ่งจะเห็นได้ว่าการกระจายของค่าการตรวจวัดของปริมาณ Hb Bart's และ Hb E จากทั้ง 2 เครื่อง มีค่าสอดคล้องกันดี

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของผลการตรวจวัดระหว่าง 2 เครื่อง โดยคำนวณผลต่างของการตรวจวัดจากทั้ง 2 เครื่อง (difference; ค่าจากเครื่อง Primus -

ค่าจากเครื่อง Variant) พบว่า ค่ามัธยฐาน (95% confidence interval) ของค่าความแตกต่างของปริมาณ Hb Bart's มีค่าเท่ากับ -0.2 (-0.3, -0.1) และของปริมาณ Hb E มีค่าเท่ากับ -0.15 (-0.3, -0.05) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และ Hb E

จากทั้ง 2 เครื่องแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wilcoxon sign rank sum test; $P < 0.001$ สำหรับ Hb Bart's และ $P = 0.008$ สำหรับ Hb E) การกระจายของค่าความแตกต่างระหว่าง 2 เครื่อง ทั้งปริมาณ Hb Bart's และ Hb E แสดงไว้ใน รูปที่ 2c และ 2d



รูปที่ 2 การกระจายของปริมาณ Hb Bart's (a) และ Hb E (b) และค่าความแตกต่างระหว่าง 2 เครื่องของการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's (c) และ Hb E (d)

ปริมาณ Hb Bart's และ Hb E จำแนกตามจีโนไทป์ของธาลัสซีเมีย

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ Hb Bart's จำแนกตามจีโนไทป์ของธาลัสซีเมีย พบว่า ค่าที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus มีแนวโน้มที่ต่ำกว่าค่าที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง Variant ในเกือบทุกจีโนไทป์ และมีแนวโน้มสูงขึ้นตามจำนวนยีนอัลฟาโกลบินที่ผิดปกติทั้งในกลุ่มที่มีและไม่มี Hb E (ตารางที่ 1) ส่วนผลการตรวจวัดปริมาณ Hb E

นั้น พบว่าในกลุ่มที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous Hb E มีแนวโน้มของค่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus ที่ต่ำกว่าผลการตรวจวัดด้วยเครื่อง Variant เช่นเดียวกับผลการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's และพบว่า ปริมาณ Hb E ในกลุ่มพาหะ Hb E ที่ยีน α -thalassemia ร่วมมีแนวโน้มของปริมาณ Hb E ที่ต่ำลงตามจำนวนยีน α -thalassemia ที่แฝงอยู่ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณ Hb Bart's (mean $\pm$ standard deviation) ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่อง จำแนกตามจีโนไทป์ของธาลัสซีเมีย

Genotype (no.)	% Hb Bart's		P-value (paired t-test)
	Primus	Variant	
Non α -thal and non-Hb E (29)	1.3 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.8	0.03
Heterozygous α -thal 2 (29) ^a	1.4 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.6	< 0.001
Heterozygous Hb CS or Hb Ps (12)	2.8 $\pm$ 1.4	3.6 $\pm$ 1.1	0.008
Homozygous α -thal 2 (1)	6.4	5.9	nd
Compound heterozygous α -thal 2/Hb CS (4)	12.1 $\pm$ 0.6	11.5 $\pm$ 0.7	nd
Heterozygous α -thal 1 (15)	11.7 $\pm$ 2.0	12.1 $\pm$ 2.5	0.324
Compound heterozygous α -thal 1/ α -thal 2 (2)	31.7, 31.8	32.3, 33.6	nd
Heterozygous Hb E (2)	1.0, 1.2	1.5, 0.6	nd
Heterozygous Hb E with α -thal 2 (7)	1.6 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 1.0	nd
Heterozygous Hb E with Hb CS (4)	2.8 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 1.2	nd
Heterozygous Hb E with α -thal 2/Hb CS (1)	9.9	9.6	nd
Heterozygous Hb E with homozygous α -thal 2 (3) ^b	4.8 $\pm$ 3.3	5.3 $\pm$ 3.9	nd
Heterozygous Hb E with α -thal 1 (3)	11.9 $\pm$ 1.1	12.1 $\pm$ 1.5	nd
Homozygous Hb E with α -thal 1 (1)	12.1	10.0	nd

nd: not done

a: 28/29 ราย เป็นชนิด 3.7 kb deletion, 1 ราย เป็นชนิด 4.2 kb deletion

b: 2/3 ราย เป็น ชนิด homozygous 3.7 kb deletion, 1 ราย เป็นชนิด compound heterozygous 3.7/4.2 kb deletion

ตารางที่ 2 ปริมาณ Hb E (mean $\pm$ standard deviation) ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่อง จำแนกตามจีโนไทป์ของธาลัสซีเมีย

Genotype (no.)	% Hb E		P-value (paired t-test)
	Primus	Variant	
Heterozygous Hb E (56)	3.0 $\pm$ 1.2	3.3 $\pm$ 1.1	0.015
Heterozygous Hb E with α -thal 2 (12)	3.2 $\pm$ 1.7	3.1 $\pm$ 1.6	nd
Heterozygous Hb E with Hb CS (4)	2.3 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.7	nd
Heterozygous Hb E with α -thal 2/Hb CS (1)	1.5	1.8	nd
Heterozygous Hb E with α -thal 1 (3)	2.2 $\pm$ 0.8	2.2 $\pm$ 0.2	nd
Heterozygous Hb E with homozygous α -thal 2 (3) ^a	4.1 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.7	nd
Homozygous Hb E (5)	6.6 $\pm$ 2.4	7.4 $\pm$ 2.3	nd
Homozygous Hb E with α -thal 1 (1)	6.4	6.7	nd

nd: not done

a: 2/3 ราย เป็น ชนิด homozygous 3.7 kb deletion, 1 ราย เป็นชนิด compound heterozygous 3.7/4.2 kb deletion

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดสายสะดือทารกแรกคลอดในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ 2 เครื่องที่ใช้หลักการ HPLC เหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันในส่วนโปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูล โดยที่เครื่อง Primus นั้นจะมีข้อดีของการวิเคราะห์ชนิดฮีโมโกลบินโดยอาศัย relative retention time (REL RT) ซึ่งคำนวณจาก RT ของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดหารด้วย RT ของฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ใช้ในการปรับ (calibrate) เครื่อง ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ FASC⁽¹⁷⁾ และวิเคราะห์ปริมาณจากทุก peak ที่ถูกชะออกมา ส่วนเครื่อง Variant (β -thalassemia short program) นั้นจะวิเคราะห์ชนิดจาก RT ของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดโดยตรง และวิเคราะห์ปริมาณโดยกำหนดให้เริ่มวิเคราะห์ที่ RT ประมาณ 0.7 นาที ซึ่งต่อมาได้มีผู้ทำการศึกษาการปรับโปรแกรมเพื่อให้สามารถ

วิเคราะห์ปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ได้ เพื่อให้ใช้ประโยชน์ได้ในวงกว้างมากขึ้น และนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's ในทารกแรกคลอด ซึ่งพบว่าสามารถใช้ในการทำนายจีโนไทป์ของอัลฟาธาลัสซีเมียในทารกแรกคลอดได้⁽⁶⁾ และน่าจะสามารถนำไปใช้ทำนายความรุนแรงของโรคอัลฟาธาลัสซีเมียในผู้ใหญ่ได้⁽⁸⁻⁹⁾ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ประเมินผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินในทารกแรกคลอดด้วยเครื่องฮีโมโกลบินอัตโนมัติทั้ง 2 เครื่อง โดยให้ความสำคัญกับปริมาณ Hb Bart's ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่คาดว่าจะสามารถนำไปใช้ในการทำนายอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 และ Hb E ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เป็นเป้าหมายในแผนงานควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียของประเทศ และจะเห็นว่าผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินจะมีลักษณะโครมาโตแกรมที่คล้ายคลึงกันทั้ง 2 เครื่อง (รูปที่ 1)

จากการเปรียบเทียบปริมาณ Hb Bart's และ Hb E ในตัวอย่างที่ปรากฏ peak และมีปริมาณมากกว่าร้อยละ 1 จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus และนำมาตรวจวัดด้วยเครื่อง Variant ถึงแม้ว่าในภาพรวมของผลการตรวจวัดของปริมาณ Hb Bart's และ Hb E จะมีความสอดคล้องกันดี (รูปที่ 2a และ 2b) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความต่าง (difference) ระหว่าง 2 เครื่อง โดยสร้างกราฟแสดงการกระจายของผลต่างระหว่าง 2 เครื่อง จะเห็นได้ว่า ผลการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's มีการกระจายของค่าความแตกต่างมากกว่าผลการตรวจวัดปริมาณ Hb E (รูปที่ 2c และ 2d) ทั้งนี้เนื่องจากในตำแหน่งเดียวกับที่ Hb Bart's ถูกชะออกมานั้น เป็นตำแหน่งที่อาจมีสารที่รบกวนการตรวจวัดได้มากกว่า ในตำแหน่งของ Hb E จากการสังเกตมักพบ peak ในตำแหน่งเดียวกับ Hb Bart's นี้ได้ในเกือบทุกตัวอย่างที่ตรวจวัด โดยในกลุ่มที่ตรวจไม่พบยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย พบปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 1.3 ± 0.3 และ 1.6 ± 0.8 เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus และ Variant ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ส่วนผลการตรวจวิเคราะห์แยกชนิดฮีโมโกลบินจากทั้ง 2 เครื่องนั้นพบว่าเครื่อง Variant จะมีโอกาสตรวจพบ Hb Bart's ได้สูงกว่าเครื่อง Primus สำหรับในกลุ่มที่ไม่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย การพบ Hb Bart's ก็จะเป็นผลบวกปลอม ในขณะที่ในกลุ่มที่มียีน α -thalassemia การไม่พบ Hb Bart's ก็จะเป็นผลลบปลอม จะเห็นได้ว่าทั้ง 2 เครื่องก็จะมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม ผลที่ไม่สอดคล้องกันนี้จะพบได้เฉพาะในกลุ่มที่ไม่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมียและกลุ่มที่เป็นพาหะ α -thalassemia 2 เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาหลายการศึกษา^(18, 19) แสดงให้เห็นว่า ในกรณีที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 การใช้ปริมาณ Hb Bart's เพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถทำนายจีโนไทป์ของอัลฟาธาลัสซีเมียได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงหรือฮีโมโกลบินปากเซ (heterozygous Hb CS or Hb PS) นั้นจะมีค่าเฉลี่ยของปริมาณ Hb

Bart's สูงกว่ากลุ่มที่เป็นพาหะ α -thalassemia 2 อย่างชัดเจน ซึ่งน่าจะเป็นหลักฐานที่สนับสนุนสมมติฐานที่ว่ายีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด non-deletion จะส่งผลให้มีความไม่สมดุลของสายโกลบินมากกว่าชนิด deletion และส่งผลให้มีความรุนแรงของโรคได้มากกว่า⁽¹⁾ ส่วนในกลุ่มที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 และ โรคฮีโมโกลบินเอชนั้น จะเห็นได้ว่าปริมาณ Hb Bart's จะสูงขึ้นอย่างชัดเจน ดังเช่นที่เคยมีรายงานมาก่อน⁽²⁻⁶⁾ และพบว่าถึงแม้ว่าค่าเฉลี่ยของการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's จากทั้ง 2 เครื่องดูเสมือนว่าค่าจากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus จะต่ำกว่าผลการตรวจวัดด้วยเครื่อง Variant แต่ความต่างนั้นไม่มีนัยสำคัญทางทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหากได้มีการศึกษาหาค่า cutoff ที่เหมาะสม จะสามารถนำปริมาณ Hb Bart's ไปใช้ในการตรวจคัดกรองพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในทารกแรกคลอดได้ไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาหาค่า cutoff ที่เหมาะสมในการตรวจกรองพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในทารกแรกคลอดจำนวน 402 ราย ที่มารดามาคลอด ณ ศูนย์อนามัยที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ พบว่า ปริมาณ Hb Bart's > 8% จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus จะให้ผลความไว ความจำเพาะ และค่าการทำนายผลบวกเป็นร้อยละ 100, 97.9 และ 70.4 ตามลำดับ (ข้อมูลยังไม่ได้ตีพิมพ์)

ในส่วนของการตรวจวัดปริมาณ Hb E จากทั้ง 2 เครื่อง ก็ให้ผลในทำนองเดียวกับผลการตรวจวัดปริมาณ Hb Bart's กล่าวคือ ค่าจากเครื่อง Primus จะมีแนวโน้มที่ต่ำกว่าค่าจากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Variant (ตารางที่ 2) โดยพบมีค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงผลการศึกษาของ Sae-ung และคณะ⁽⁷⁾ ทั้งในกลุ่ม heterozygote และ homozygote และจะเห็นได้ว่า พาหะ Hb E ที่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมียร่วมจะแนวโน้มว่าปริมาณ Hb E ที่ตรวจพบก็จะต่ำลงตามจำนวนยีนอัลฟาธาลัสซีเมียที่แฝงอยู่ดังเช่นเดียวกับที่พบในผู้ใหญ่ ซึ่งอธิบายได้ด้วยความสามารถในการจับกันระหว่างสายอัลฟาและบีตาโกลบิน ($\alpha\beta$ -assembly) ในกรณีที่สายอัลฟาโกลบินในปริมาณที่จำกัดนั้น สายอัลฟาโกลบินที่มีอยู่จะชอบจับกับสายบีตาโกลบินที่ปกติ

มากกว่าสายบีตาโกลบินที่ผิดปกติไปเป็นบีตาอี จึงตรวจพบปริมาณ Hb E ได้ต่ำลง นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มที่ไม่มี Hb E ส่วนใหญ่จะตรวจไม่พบ peak ในตำแหน่งเดียวกันนี้ หรืออาจพบในปริมาณที่น้อยกว่าร้อยละ 1 ของฮีโมโกลบินทั้งหมด เนื่องจากในทารกแรกคลอดนั้นยังมีการสร้างสาย δ -globin ได้น้อยมาก⁽¹⁾ ดังนั้นการพบ peak ในตำแหน่งนี้และมีปริมาณมากกว่าร้อยละ 1 ของฮีโมโกลบินทั้งหมด จึงน่าจะทำนายได้ว่าทารกแรกคลอดรายนั้นน่าจะเป็นพาหะ Hb E อย่างไรก็ตามจากการศึกษาหาค่า cutoff จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus พบว่าปริมาณ Hb E ที่มากกว่าร้อยละ 1 จะไม่ครอบคลุมพาหะ Hb E ทุกราย ค่า cutoff ที่เหมาะสมสำหรับการคัดกรองพาหะ Hb E ในทารกแรกคลอดจากการตรวจวัดด้วยเครื่อง Primus คือ Hb E > 0.5% ซึ่งให้ผลความถูกต้องร้อยละ 100 (ข้อมูลยังไม่ได้ดีพิมพ์)

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะทำการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้หลักการพื้นฐานเดียวกันก็อาจมีค่าการตรวจวัดที่แตกต่างกันได้ ซึ่งผู้ใช้งานควรจะมีการศึกษาว่าค่าการตรวจวัดที่แตกต่างกันนั้น มีผลให้การวินิจฉัยโรคเป้าหมายผิดพลาดหรือไม่ก่อนที่จะนำไปใช้งานจริง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากบัณฑิตวิทยาลัย และศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้รับการสนับสนุนการใช้เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Primus CLC 330 และน้ำยาการตรวจวิเคราะห์จากบริษัท L&R Enterprise Ltd. ประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. 4th ed. Oxford: Blackwell Science; 2001.
2. Lie-Injo LE, Solai A, Herrera AR, Nicolaisen L, Kan YW, Wan WP, Hasen K. Hb Bart's level in cord blood and deletion of α -globin genes. Blood 1982; 59: 370-6.
3. 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.
4. Tanphaichitr VS, Pung-amritt P, Puchaiwatananon 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.
5. 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.
6. Rugless MJ, Fisher CA, Stephens AD, Amos RJ, Mohammed T, Old JM. Hb Bart's in cord blood: an accurate indicator of α -thalassemia. Hemoglobin 2006; 30: 57-62.
7. Sae-ung N, Fucharoen G, Fucharoen S. Expression of hemoglobin E in newborn. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995; 26 (Suppl 1): 246 - 8.
8. รสริณ การเพียร, สุมาลี อบเชย, กุลนภา พู่เจริญ, ยศสมบัติ จังตระกุล, ดวงฤดี จังตระกุล, สุทธิพรรณ กิจเจริญ และคณะ. ความสัมพันธ์ของอัลฟา- ธาลัสซีเมียจีโนไทป์กับปริมาณฮีโมโกลบินบาร์ทส์และเอชที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน อัตโนมัติในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2549; 18: 17-23.

9. สุทธิพรรณ กิจเจริญ, วุฒิชัย สุขสนิท, รัชวรรัตน์ ปิยะพงษ์กุล, ยศสมบัติ จังตระกุล, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, ณัฐยา แซ่อึ้ง, กุลนภา พุเจริญ. การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ Hb Bart's และ Hb H ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติกับการชะล้างออกจากแผ่นเซลล์โลสอะซีเตทที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้า. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2549; 18: 51-9.
10. Fucharoen G, Fucharoen S. Rapid and simultaneous non-radioactive method for detecting α -thalassemia 1 (SEA-type) and Hb Constant Spring genes. Eur J Haematol 1994; 53: 186-7.
11. Sae-Ung N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. α -Thalassemia and related disorders in northeast Thailand: a molecular and hematological characterization. Acta Haematol 2006; 117:78-82.
12. Fucharoen S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Pengjam Y. Molecular analysis of a Thai β -thalassemia heterozygote with normal hemoglobin A₂ level: implication for population screening. Ann Clin Biochem 2002; 39: 44-9.
13. Fucharoen S, Fucharoen G, Fukumaki Y. Simple non-radioactive method for detecting hemoglobin Constant Spring gene. Lancet 1990; 335: 1527.
14. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Hb Paksé [α 2, codon 142 (TAA→TAT or Term→Tyr)] in Thai patients with EABart's disease and Hb H disease. Hemoglobin 2002; 26: 227-35.
15. Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Panyasai S, Devenish R, Luy L. Interaction of hemoglobin E and several forms of α -thalassemia in Cambodian families. Haematologica 2003; 88: 1092-8.
16. Fucharoen S, Fucharoen G, Rattanasiri T, Jetsrisuparp A, Fukumaki Y. A simple non-radioactive assay for hemoglobin E gene in prenatal diagnosis. Clin Chim Acta 1994; 229: 197-203.
17. Primus CLC 330. Manual guide. Primus Corporation, Kansas City, 1999.
18. Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, Liao C, Zhou M, Chen PY, et al. The prevalence and spectrum of α and β thalassemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening. J Clin Pathol 2004; 57: 517-22.
19. van der Dijs FP, Volmer M, van Gijssel-Wiersma DG, Smit JW, van Veen R, Muskiet FA. Predictive value of cord blood hematological indices and hemoglobin Bart's for the detection of heterozygous α -thalassemia-2 in an African-Caribbean population. Clin Chem 1999; 45: 1495-500.