

การตรวจวัดปริมาณฮีตาโกลบินในเม็ดเลือดแดงด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี

พัชรชาติ พระยาโล^{1,2*}, ณัฐยา แซ่ฮึง², กุลนภา ฟูเจริญ², สุพรรณ ฟูเจริญ²

Received: May 23, 2012

Revised & Accepted: July 10, 2012

บทคัดย่อ

สายฮีตาโกลบินเป็นโปรตีนที่มีการสร้างขึ้นตั้งแต่ระยะ 2 เดือนแรกของการตั้งครรภ์จนถึงประมาณ 3 เดือนหลังคลอด ผู้ใหญ่ปกติมักตรวจไม่พบฮีตาโกลบินในเม็ดเลือดแดงหากใช้เทคนิคที่มีความไวไม่เพียงพอ แต่พบได้มากขึ้นในผู้ที่ เป็นอัลฟาธาลัสซีเมีย การศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิคโฟลไซโตเมทรีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณฮีตาโกลบินในเม็ดเลือดแดง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อฮีตาโกลบินและคอนจูเกตกับสารเรืองแสง R-Phycoerythrin ทำการศึกษาในเม็ดเลือดแดงของ คนปกติ พาหะอัลฟาธาลัสซีเมียและผู้ป่วยโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย ตรวจพบปริมาณฮีตาโกลบินในคนปกติ 3 ราย มีค่าร้อยละ 1.0 ± 0.7 พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA deletion) 6 รายมีค่าร้อยละ 9.0 ± 2.0 พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ที่มีฮีโมโกลบินอีรวม 4 รายมีค่าร้อยละ 9.0 ± 6.4 ผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช 2 รายมีค่าร้อยละ 14.3 และ 13.9 และในทารกที่เป็นโรค Hb Bart's hydrops fetalis 1 รายมีค่าร้อยละ 68.0 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิคโฟลไซโตเมทรีในการตรวจวัดปริมาณฮีตาโกลบินที่มีอยู่ในเม็ดเลือดแดงได้และปริมาณที่วัดได้มีความสัมพันธ์กับชนิดของความผิดปกติของยีนอัลฟาโกลบินด้วย จึงอาจพัฒนาต่อไปสำหรับการคัดกรองหรือวินิจฉัยอัลฟาธาลัสซีเมียได้

คำสำคัญ: อัลฟาธาลัสซีเมีย, สายฮีตาโกลบิน, โฟลไซโตเมทรี

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Flow cytometric determination of zeta globin chain in red blood cells

Patcharawadee Prayalaw^{1,2 *}, Nattaya Sae-Ung²,
Goonnapa Fucharoen², Supan Fucharoen²

Abstract

ζ-globin chain is a globin protein synthesized during the first 2 months of gestation to about 3 months after birth. Without appropriate technique, no ζ-globin chain could be detected in normal adult but the level is increased in individual with α-thalassemia. In this study, a technique of flow cytometry has been applied to determination of ζ-globin chain in red blood cells. The ζ-globin chain in red blood cells was detected using MoAb - ζ globin - RPE. Study was done on normal individuals, α-thalassemia 1 carriers (SEA deletion) and α-thalassemia diseases. The levels of ζ-globin chain were found to be $1.0 \pm 0.7 \%$ in 3 normal individuals, $9.0 \pm 2.0 \%$ in 6 α-thalassemia 1 carriers and $9.2 \pm 6.4 \%$ in 4 double heterozygotes for α-thalassemia 1 with Hb E. The levels of 14.3 % and 13.9 % were detected in two patients with Hb H disease whereas a fetus with Hb Bart's hydrops fetalis had ζ-globin chain of as high as 68.0 %. This data indicates that flow cytometric assay could be used to demonstrate ζ-globin chain in red blood cells and the amounts detected are correlated with number of α-globin defect. With further development, the technique might be useful for screening and diagnosis of α-thalassemia in a prevention and control program.

Keywords: α-Thalassemia, Zeta globin chain, Flow cytometry

¹ Graduate School, Khon Kaen University

² Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories,
Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

* Corresponding author: (e-mail: patchprayalaw@gmail.com)

บทนำ

อัลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติในการสังเคราะห์สายอัลฟาโกลบิน แบ่งออกเป็น α -thalassemia 1 (α^0 -thalassemia) และ α -thalassemia 2 (α^+ -thalassemia) พบอุบัติการณ์สูงแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค ชนิดที่มีความสำคัญ คือ α -thalassemia 1 ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค Hb Bart's hydrops fetalis ทำให้ทารกเสียชีวิตขณะคลอดเนื่องจากภาวะนี้ทำให้มีการขาดหายไปของยีนอัลฟาโกลบินทั้ง 4 ยีน⁽¹⁾ ในคนไทยตรวจความผิดปกติได้ 2 ชนิด คือ ชนิด SEA deletion ที่พบได้บ่อยและชนิด THAI deletion ที่พบได้น้อยกว่า ผู้ใหญ่ที่เป็นพาหะ α -thalassemia 1 ชนิด SEA deletion มีการแสดงออกของสายซิตาโกลบินปริมาณน้อยในเม็ดเลือดแดง⁽²⁾ สายซิตาโกลบินเป็นส่วนประกอบสำคัญของ Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$) และ Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) ในผู้ใหญ่ปกติ มักตรวจไม่พบแม้จะทำการตรวจที่มีความไวสูง เช่น immunoassay⁽³⁻⁵⁾ แต่ในผู้ที่เป็นพาหะ α -thalassemia 1 ชนิด SEA deletion อาจตรวจพบได้ในเลือด ส่วนผู้ที่เป็นพาหะ α -thalassemia 2 ที่มีการขาดหายไปของยีนอัลฟาโกลบินเพียงยีนเดียวและพาหะ α -thalassemia 1 ชนิด FIL deletion และ MED deletion จะตรวจไม่พบ⁽⁵⁾

การตรวจวัดปริมาณซิตาโกลบินทำได้หลายวิธี เช่น radioimmunoassay (RIA), Triton X-100/urea/polyacrylamide gel electrophoresis, slot blot immunobinding assay (SBIA), immunocytochemical techniques, reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), ELISA และ flow cytometry⁽⁶⁻¹²⁾ การศึกษานี้ได้นำเทคนิคโฟลไซโตเมทรีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณซิตาโกลบินในเม็ดเลือดแดง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซิตาโกลบินและคอนจูเกตกับสารเรืองแสง R-Phycoerythrin (MoAb - ζ globin chain - RPE) ศึกษาเปรียบเทียบในตัวอย่างเลือดคนปกติ ผู้ที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมียและผู้ที่เป็นโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างเลือดและการตรวจทางโลหิตวิทยา

ตัวอย่างเลือดใหม่จำนวน 16 ราย ได้เจาะเก็บจากผู้เข้ามารับการตรวจยืนยันฮีโมโกลบินและดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ที่หน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและ

พัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตัวอย่างทุกรายได้รับการตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงโดยใช้เครื่อง URIT-2900⁽¹³⁾ และวิเคราะห์ชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธี automated capillary electrophoresis (Capillaris 2: Sebia, France)⁽¹⁴⁾ การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE542233)

2. การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณซิตาโกลบินที่มีในเม็ดเลือดแดงโดยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี ซึ่งดัดแปลงมาจาก Munde และคณะ⁽¹⁵⁾ ใช้เลือด 20 ไมโครลิตร (ปรับให้ได้ 45-50 % ฮีมาโตคริต) ใน 0.05 % glutaraldehyde ใน phosphate buffer saline ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ส่วนผสม 1) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ดูดส่วนผสม 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเติมใน 0.1% Triton X-100 ใน 0.1% BSA-PBS (ส่วนผสม 2) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นดูดส่วนผสม 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเติมลงในโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซิตาโกลบิน และคอนจูเกตกับสารเรืองแสง R-Phycoerythrin (MoAb - ζ globin chain - RPE) 5 ไมโครลิตร เติม 0.1% BSA-PBS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที จากนั้นเติม 1% formaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตรจะได้ส่วนผสมที่สามารถนำไปตรวจวัดปริมาณซิตาโกลบินในเม็ดเลือดแดงโดยวิธีโฟลไซโตเมทรี

3. โฟลไซโตเมทรี

ใช้เครื่อง Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Miami, FL, U.S.A.) อัตราความเร็วในการเคลื่อนที่ของเซลล์สูงและหยุดนับอัตโนมัติเมื่อเม็ดเลือดแดงครบ 10,000 เซลล์ ใช้ FSS และ log SSC ในการตีกรอบเลือกกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง

ผลการศึกษา

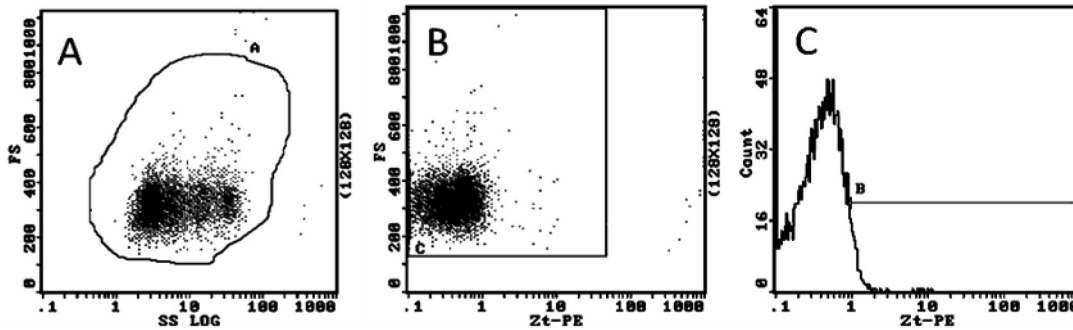
ตัวอย่างทั้งหมดทั้งหมดที่ศึกษาจำนวน 16 ราย ประกอบด้วย คนปกติ 3 ราย, พาหะ α -thalassemia 1 จำนวน 6 ราย, พาหะ α -thalassemia 1 ที่มีฮีโมโกลบินอีวร่วม 4 ราย, ผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช 2 ราย และโรค Hb Bart's hydrops fetalis 1 ราย มีข้อมูลทางโลหิตวิทยาดังแสดงในตารางที่ 1 ทุกรายถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณซิตาโกลบินในเม็ด

เลือดแดงโดยใช้เทคนิคโพลไซโตเมทรีดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 1 ผลการศึกษาพบว่า คนปกติมีค่า Hb 15.5 ± 0.4 g/dl, MCV 90.2 ± 3.8 fl และ MCH 28.4 ± 0.7 pg มีปริมาณซีตาโกลบินร้อยละ 1.0 ± 0.7 ผู้ที่เป็นพาหะ α -thalassemia 1 (SEA deletion) พบลักษณะ hypochromic microcytosis ชัดเจนโดยมี Hb 11.9 ± 1.6 g/dl, MCV 67.6 ± 1.6 fl และ MCH 21.5 ± 1.1 pg ตรวจพบปริมาณซีตาโกลบินร้อยละ 9.0-2.0 ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับที่ตรวจพบในผู้ที่เป็นพาหะ double heterozygote α -thalassemia 1 / Hb E คือร้อยละ 9.2 ± 6.4 ผู้ที่เป็นโรคฮีโมโกลบินเอช 2 รายซึ่งมีจีโนไทป์เป็น ($--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$) และ ($--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$) อย่างละ

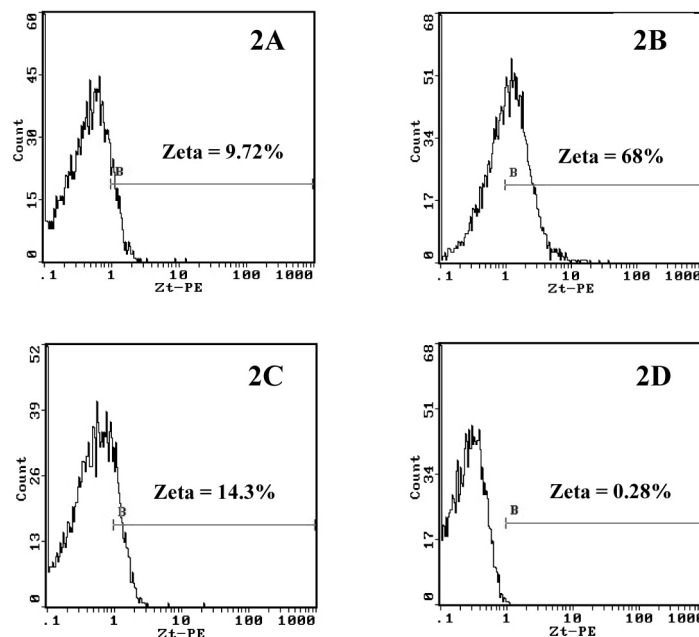
1 ราย ตรวจพบปริมาณซีตาโกลบินร้อยละ 14.3 และ 13.9 ตามลำดับ ส่วนผู้ที่เป็นโรค Hb Bart's hydrops fetalis 1 ราย ตรวจพบมีปริมาณซีตาโกลบินร้อยละ 68.0 ตัวอย่างการตรวจและผลการวิเคราะห์แสดงไว้ใน รูปที่ 2 ซึ่งแสดงฮิสโตแกรมการตรวจหาปริมาณซีตาโกลบินในเม็ดเลือดแดงโดยใช้ MoAb - ζ globin chain - RPE ด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรีของตัวอย่าง 4 ราย ประกอบด้วย พาหะ α -thalassemia 1 (ร้อยละ 9.72), โรค Hb Bart's hydrops fetalis (ร้อยละ 68.0), โรคฮีโมโกลบินเอช (ร้อยละ 14.3) และคนปกติ (ร้อยละ 0.28)

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและปริมาณซีตาโกลบินในเม็ดเลือดแดงของผู้ที่มีจีโนไทป์ต่างๆที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรีในการศึกษานี้ แสดงเป็นข้อมูลดิบหรือ mean $\pm$ SD

	1	2	3	4	5
number	3	6	4	2	1
α -genotype	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$--^{SEA}/\alpha\alpha$	$--^{SEA}/\alpha\alpha$	$--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$, $--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$	-- / --
Rbc ($\times 10^{12}/l$)	5.4 ± 0.1	5.5 ± 0.6	5.8 ± 1.0	4.6, 5.2	2.5
Hb (g/dl)	15.5 ± 0.4	11.9 ± 1.6	12.8 ± 2.7	8.6, 9.7	6.3
Hct (%)	48.9 ± 1.8	37.3 ± 4.3	38.4 ± 5.2	32.7, 29.9	28.3
MCV (fl)	90.2 ± 3.8	67.6 ± 1.6	66.6 ± 4.6	71.0, 57.3	111.8
MCH (pg)	28.4 ± 0.7	21.5 ± 1.1	21.9 ± 1.2	18.6, 18.5	24.8
MCHC (g/dl)	31.6 ± 1.8	31.9 ± 1.6	33.2 ± 2.7	26.2, 32.4	22.2
RDW (%)	14.8 ± 0.4	17.1 ± 0.6	15.9 ± 1.5	19.8, 15.0	24.7
Hb type	A_2A	A_2A	EA	CSA_2ABH, A_2ABH	Embryonic Hb Bart's
HbA ₂ / E (%)	2.6	2.4 ± 0.6	19.6 ± 1.1	1.3, 1.7	Hb Bart's = 90.4
Hb F (%)	-	-	0.7 ± 0.3	-	-
ζ - globin chain (%)	1.0 ± 0.7	9.0 ± 2.0	9.2 ± 6.4	14.3, 13.9	68.0



รูปที่ 1 แสดงฮิสโตแกรมของซีตาโกลบินโดยวิธีโฟลไซโตเมทรี A: dot density plot histogram แสดงการตีกรอเลือกกลุ่มเม็ดเลือดแดงด้วย FSC และ Log SSC B,C: dot density plot and single channel histogram ในตัวอย่างที่เป็นพาหะ α -thalassemia 1 (มี ζ -globin ร้อยละ 4.7)



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างฮิสโตแกรมของซีตาโกลบินในเม็ดเลือดแดงโดยใช้ MoAb - M globin chain – RPE และเทคนิคโฟลไซโตเมทรีของตัวอย่าง 4 ราย ประกอบด้วย A: พาหะ α -thalassemia 1 (ร้อยละ 9.72), B: โรค Hb Bart's hydrops fetalis (ร้อยละ 68.0), C: Hb H disease (--^{SEA}/ α ^{CS} α) (ร้อยละ 14.3) และ D: คนปกติ (ร้อยละ 0.28)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

Embryonic Hb ที่พบในระยะ embryo คือ Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) และ Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) ซึ่งมีสายซีตาโกลบินเป็นส่วนประกอบใน Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$) และ Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) สายซีตาโกลบินที่สามารถพบได้ในกระแสเลือดปริมาณน้อยนี้จะพบได้จนถึงอายุได้ประมาณสามเดือนหลังจากคลอด ยกเว้นในรายที่เป็นโรค Hb Bart's hydrops fetalis ซึ่งเกิดจากการขาดหายไปของ ζ globin gene ทั้ง 4 gene ทำให้มีการแสดงออกของ

globin gene เพิ่มขึ้น อีกทั้งพบว่าในพาหะ α -thalassemia 1 สามารถตรวจพบว่ามีแสดงออกของ ζ gene อยู่ จึงทำให้ตรวจวัดซีตาโกลบินในเม็ดเลือดแดงเป็นปริมาณได้โดยเทคนิคต่างๆ ที่มีความไวเพียงพอ

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคโฟลไซโตเมทรีเพื่อตรวจวัดปริมาณซีตาโกลบินในเม็ดเลือดแดงซึ่งการทำงานของโฟลไซโตมิเตอร์จะอาศัยการวัดเซลล์ที่กำลังไหลอยู่ ซึ่งจะวัดปริมาณของสารเรืองแสงที่แปลงบนผิวเซลล์ หรือภายในเซลล์ ขณะที่ไหลผ่านทางกรวยของเครื่อง เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ใน

อัตราความเร็ว 500-1000 เซลล์/วินาที เมื่อเซลล์ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ แสงที่กระทบเซลล์จะเกิดการหักเหแสงเป็น 2 ทิศทาง ในตัวเครื่องจะมี detector มารับการหักเหของแสง ซึ่งจะวัดค่าการหักเหของแสงเป็นมุมแคบทางด้านหน้าทำให้สามารถบอกขนาดเซลล์ได้และวัดค่าการหักเหของแสงที่ออกจากเซลล์จะทำให้สามารถวัดส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ จากนั้นเครื่องก็จะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้าและส่งข้อมูลไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลออกมา เนื่องจากฮีโมโกลบินหรือสายโกลบินอยู่ในไซโตพลาสซึมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นก่อนการย้อมจึงจำเป็นต้องทำการตรึงเซลล์และทำให้เซลล์เป็นรู เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่จะทำการตรวจวัดมีรูปร่างที่คงตัวและเพื่อให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงเข้าไปจับกับฮีโมโกลบินหรือสายโกลบินที่มีอยู่ในเซลล์ได้ การศึกษาครั้งนี้ใช้ 0.05 % glutaraldehyde ใน PBS เพื่อตรึงเซลล์และใช้ 0.1% Triton X-100 ใน 0.1% BSA-PBS เพื่อทำให้เซลล์เป็นรู

การประยุกต์ใช้โฟลไซโตเมทรีซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูงในการตรวจวัดปริมาณซีตาโกลบินโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซีตาโกลบินและคอนจูเกตกับสารเรืองแสง R-Phycoerythrin ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณซีตาโกลบินได้อย่างชัดเจนในตัวอย่างที่มีความผิดปกติของการสร้างสายอัลฟาโกลบิน ได้แก่ พะหะ α -thalassemia 1, Hb H disease และ Hb Bart's hydrops fetalis ส่วนปริมาณซีตาโกลบินที่ตรวจวัดได้ในคนปกติที่มีค่าในระดับร้อยละ 1.0 ± 0.7 นั้น สะท้อนให้เห็นถึงความไวของวิธีโฟลไซโตเมทรีที่สามารถตรวจวัดปริมาณซีตาโกลบินในปริมาณน้อยได้ เมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่ได้ พบว่าปริมาณซีตาโกลบินที่ตรวจวัดได้แปรผันตามความรุนแรงของความผิดปกติและการเกิดโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย กล่าวคือพบซีตาโกลบินใน Hb Bart's hydrops fetalis Hb H disease พะหะ α -thalassemia 1 ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนอัลฟาโกลบินยีนที่ขาดหายไป ดังนั้นเชื่อว่าหากได้รับการพัฒนาต่อไป เทคนิคโฟลไซโตเมทรีนี้ จะสามารถพัฒนาไปสู่เทคนิคการตรวจคัดกรองและช่วยวินิจฉัยโรคอัลฟาธาลัสซีเมียได้^(16,17) ดังเช่นที่ได้มีการพัฒนาเป็นชุดตรวจขึ้นแล้วด้วยเทคนิค ELISA และ immunochromatographic assay ในประเทศจีน^(18,19)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. สุพรรณ พุเจริญ, ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทย: แนวทางการตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุล. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2554; 23: 1-6.
2. Chui DHK, Wong JC, Chung SW, Patterson M, Bhargava S, Poon MC. Embryonic ζ -globin chains in adults: A marker for α -thalassemia 1 hapotype due to $\alpha > 17.5$ kb deletion. N Engl J Med 1986; 314:76-9.
3. Peschle C, Mavilio F, Cae A, Migliaccio G, Migliaccio AR, Salvo G, et al. Haemoglobin switching in human embryos: Asynchrony of $\zeta \rightarrow \alpha$ and $\epsilon \rightarrow \gamma$ globin switches in primitive and definitive erythropoietic lineage. Nature 1985;313: 235-238.
4. Chui DHK, Mentzer WC, Patterson M, Iarocci TA, Embury SH, Perrine SP, et al. Human embryonic ζ -globin chains in fetal and newborn blood. Blood 1989; 74: 1409-14.
5. Tang W, Luo HY, Albitar M, Patterson M, Eng B, Waye JS, et al. Human embryonic ζ -globin chain expression in deletion α -thalassemias. Blood 1992; 80: 517-22.
6. Luo HY, Clarke BJ, Gaudie J, Patterson M, Liao S, Chui DHK. A novel monoclonal antibody based on diagnostic test for α -thalassemia 1 carrier due to the ($-\text{SEA}$) deletion. Blood 1988; 72:1589-94.
7. Lafferty JD, Barth DS, Sheridan BL, McFarlane AG, Halchuk LM, Raby A, et al. A multicenter trial of the effectiveness of ζ -globin enzyme-linked immunosorbent assay and hemoglobin H inclusion body screening for the detection of α^0 -thalassemia trait. Am J Clin Pathol 2008; 129:

- 309-15.
8. Kular F, Fei YJ, Wilson JB, Kutlar A, Huisman TH. Detection of the embryonic ζ -globin chain in blood from newborn babies by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987; 394: 333.
9. Ausavarungnirun R, Winichagoon P, Fucharoen S, Epstein N, Simkins R. Detection of ζ -globin chains in the cord blood by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Rapid screening for $\alpha\alpha$ -thalassemia 1 (Southeast Asian Type). *Am J Hematol* 1998; 57: 283-6.
10. Ma SK, Ma V, Chan AYY, Chan LC, Chui DHK. Routine screening of ($\alpha\alpha$ -^{SEA}) α -thalassemia deletion by an enzyme-linked immunosorbent assay for embryonic ζ -globin chains. *Acta Haematol* 2002; 108: 8-12.
11. Tang L, Zhu P, Zhou WJ, Zheng J, Zhou YQ, Fu N, et al. Development and validation of a ζ -globin specific ELISA for carrier screening of the ($\alpha\alpha$ -^{SEA}) α -thalassaemia deletion. *J Clin Pathol* 2009; 62: 147-51.
12. Campbell TA, Ware RE, Mason M. Detection of hemoglobin variants in erythrocytes by flow cytometry. *Cytometry* 1999; 35: 242-8.
13. Karnpean R, Pansuwan A, Fucharoen G, Fucharoen S. Evaluation of the URIT 2900 Automated Hematology Analyzer for screening of thalassemia and hemoglobinopathies in Southeast Asian populations. *Clin Biochem* 2011; 44: 889-93.
14. Srivorakun H, Fucharoen G, Sae-ung N, Sanchaisuriya K, Ratanasiri T, Fucharoen S. Analysis of fetal blood using capillary electrophoresis system: a simple method for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases. *Eur J Haematol* 2009; 83: 57-65.
15. Mundee Y, Bigelow NC, Davis BH, Porter JB. Simplified flow cytometric method for fetal haemoglobin containing red blood cells. *Cytometry* 2000; 42: 389-93.
16. กุลนภา ฟูเจริญ, สุพรรณ ฟูเจริญ. การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียในประเทศไทย. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2551; 20: 165-77.
17. สุพรรณ ฟูเจริญ, กุลนภา ฟูเจริญ. ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในคนไทยและแนวทางการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2553; 22: 103-17.
18. Tang L, Zhu P, Zhou WJ, Zheng J, Zhou YQ, Fu N, et al. Development and validation of a zeta globin specific ELISA for carrier screening of the ($\alpha\alpha$ -SEA) α -thalassemia deletion. *J Clin Pathol* 2009; 62: 147-51.
19. Wen L, Zhu P, Liu Y, Pan Q, Qu Y, Xu X, et al. Development of a fluorescence immunochromatographic assay for the detection of zeta globin in the blood of ($\alpha\alpha$ -SEA) α -thalassemia carriers. *Blood Cells Mol Dis* 2012 (in press).