

การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเพื่อวินิจฉัยทารกในครรภ์มารดาที่เสี่ยงต่อโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงด้วยเครื่องวิเคราะห์ระบบโครมาโตกราฟีแรงดันต่ำ

ปัทมาพร ทองพิมพ์¹, รัฐสภา สายพัฒน์¹, กุลนภา ฟูเจริญ^{2*}, ทักษิณก ศรีวรกุล², สุภาวดี แยมศรี²,
กนกวรรณ แสนไชยสุริยา², สุพรรณ ฟูเจริญ²

Received: August 22, 2013

Revised & Accepted: September 16, 2013

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินทารกในครรภ์ที่เสี่ยงต่อโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงด้วยเครื่องวิเคราะห์ระบบโครมาโตกราฟีแรงดันต่ำ (low pressure liquid chromatography; LPLC) เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยแพทย์ในการวินิจฉัยทารกที่เสี่ยงต่อโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงก่อนได้รับผลการตรวจดีเอ็นเอ การศึกษาในครั้งนี้ได้รวบรวมข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินทารกในครรภ์มารดาด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติหลักการ LPLC ที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ จำนวน 74 ตัวอย่าง มีผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอให้การวินิจฉัยเป็น ทารกปกติ 11 ตัวอย่าง อัลฟา-ธาลัสซีเมีย 23 ตัวอย่าง รวม 8 จีโนไทป์ บีตา-ธาลัสซีเมียและหรือ Hb E 29 ตัวอย่างรวม 4 จีโนไทป์ และ Hb E ที่มีฮีนอัลฟาธาลัสซีเมียร่วม 11 ตัวอย่าง รวม 7 จีโนไทป์ ผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินของทารกปกติ พบฮีโมโกลบินชนิด FA มีปริมาณ Hb F และ Hb A ร้อยละ 88.1 ± 5.3 และ 6.6 ± 2.9 ตามลำดับ ทารกที่เป็นโรค homozygous α -thalassemia 1 จำนวน 15 ตัวอย่าง พบปริมาณ Hb Bart's ร้อยละ 99 ± 1.7 ไม่พบ Hb F และ Hb A ส่วนอัลฟา-ธาลัสซีเมียจีโนไทป์อื่นๆพบปริมาณ Hb Bart's เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นตามจำนวนความผิดปกติของฮีนอัลฟาโกลบิน ตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น β^0 -thalassemia / Hb E จำนวน 11 ตัวอย่าง พบปริมาณ Hb E และ Hb F ร้อยละ 1.1 ± 0.2 และ 95.2 ± 1.1 ตามลำดับ โดยไม่พบ Hb A เลย เหมือนกับรายที่เป็น homozygous Hb E แสดงให้เห็นว่าการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง LPLC สามารถใช้วินิจฉัยทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียรุนแรงชนิด homozygous α -thalassemia 1 ได้ แต่สำหรับ β^0 -thalassemia / Hb E นั้น หากทารกมีโอกาสเป็น homozygous Hb E ด้วย จำเป็นต้องได้รับการตรวจดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยแยก 2 ภาวะนี้ออกจากกัน

คำสำคัญ: Hemoglobin analysis, Fetal blood, LPLC, Prenatal diagnosis, Thalassemia

¹ นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 ปีการศึกษา 2555,

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Hemoglobin analysis for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases using low pressure liquid chromatography

Pattamaporn Tongpim¹, Rattasapa Saipat¹, Goonapa Fucharoen^{2*}, Hataichanok Srivorakun²,
Supawadee Yamsri², Kanokwan Sanchaisuriya², Supan Fucharoen²

Abstract

Fetal hemoglobin (Hb) analysis is an alternative method to DNA analysis for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases. Therefore in this study, fetal Hb patterns determined using low pressure liquid chromatography (LPLC) based Hb analyzer were analyzed. Study was done on 74 fetal blood specimens obtained for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases at the Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories. Globin genotypes were defined by DNA analysis using PCR and related techniques. Among 74 fetuses, there were 11 normal fetuses, 23 cases of α - thalassemia (with 8 genotypes), 29 cases with β - thalassemia and / or Hb E (with 4 genotypes) and 11 cases of Hb E / α - thalassemia (7 genotypes). Normal fetuses presented with Hb F (88.1 ± 5.3 %) and Hb A (6.6 ± 2.9 %). In 15 cases with homozygous α -thalassemia 1, only Hb Bart's (99.0 ± 1.7 %) with no Hb F and Hb A was observed. In α - thalassemia fetuses, it was found that Hb Bart's levels depended on the number of α -globin gene defect. In 11 cases with β^0 - thalassemia / Hb E disease, only Hb E (1.1 ± 0.2 %) and Hb F (95.2 ± 1.1 %) without Hb A were detected. The same pattern was found with homozygous Hb E fetus. These results demonstrate that fetal blood analysis using LPLC can be used for accurate prenatal diagnosis of homozygous α -thalassemia 1. The test can also be applied to prenatal diagnosis of β^0 -thalassemia / Hb E disease although in some cases differential diagnosis with homozygous Hb E would require further DNA testing.

Keywords: Hemoglobin analysis, Fetal blood, LPLC, Prenatal diagnosis, Thalassemia

¹ Fourth year Medical Technology student,

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

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

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นภาวะโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ เกิดจากมีความผิดปกติของยีนที่สังเคราะห์สายโกลบินทำให้สังเคราะห์สายโกลบินสายใดสายหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งสายที่ปกติไม่ได้หรือได้ในปริมาณที่น้อยลง⁽¹⁾ เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีผู้ป่วยและผู้ที่เป็นพาหะแฝงเป็นจำนวนมาก โดยเป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย (α - thalassemia) ร้อยละ 20 - 30, พาหะบีตาธาลัสซีเมีย (β - thalassemia) ร้อยละ 3 - 9, พาหะฮีโมโกลบินอีเฉลี่ยประมาณร้อยละ 30 และยังมีฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นที่จัดเป็นธาลัสซีเมียด้วย เช่น Hb Constant Spring และ Hb Pakse' อีกประมาณร้อยละ 4 ของประชากร มีผู้ป่วยที่เป็นโรคประมาณร้อยละ 1 ของประชากร⁽²⁾ กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทยได้กำหนดเป้าหมายในการดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ด้วยการตรวจคัดกรองในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรส เพื่อให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม และให้ทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ โดยกำหนดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่เป็นเป้าหมายในการควบคุมและป้องกันไว้ 3 โรค คือ homozygous α - thalassemia 1 (Hb Bart's hydrops fetalis), homozygous β - thalassemia และ β^0 - thalassemia / Hb E⁽³⁾ เนื่องจากทารกในครรภ์ที่เกิดจากคู่สมรสที่เป็นพาหะทั้งคู่มีโอกาเสี่ยงต่อการเป็นโรคร้อยละ 25 ทุกครั้งที่ตั้งครรภ์ การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคธาลัสซีเมียทั้งสามชนิดนี้ จึงมีความสำคัญและจำเป็นสำหรับการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรมแก่คู่สมรสในการพิจารณาเลือกแนวทางที่เหมาะสมต่อไป

ในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของทารกในครรภ์มารดา จะมีการเก็บตัวอย่างของทารกในครรภ์โดยสูติแพทย์ที่มีความชำนาญงาน เลือกละอองน้ำคร่ำตามความถนัดและอายุครรภ์ หากเป็นการตั้งครรภ์ในระยะ 8 - 16 สัปดาห์แรก อาจเป็นการเจาะเนื้อรก (chorionic villus or CVS) หรือน้ำคร่ำ (amniotic fluid) แต่หากเป็นระยะ 18 - 22 สัปดาห์อาจพิจารณาเจาะเลือดจากสายสะดือของทารก (fetal blood)⁽⁴⁾ ตัวอย่างสองชนิดแรกต้องตรวจด้วยวิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอเท่านั้น แต่หากเป็นเลือดทารก จะสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งดีเอ็นเอและชนิดฮีโมโกลบิน⁽⁵⁻⁸⁾ แต่การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอใช้เวลานานและมี

ให้บริการเฉพาะโรงพยาบาลหรือศูนย์การแพทย์ขนาดใหญ่เท่านั้น การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติซึ่งมีให้บริการในโรงพยาบาลทั่วไป จะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่เร็วกว่า ช่วยให้แพทย์สามารถพิจารณาแนวทางการดำเนินการต่อไปได้เร็วขึ้น

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในปัจจุบันนิยมใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ ซึ่งมีทั้งแบบที่ใช้ระบบ high pressure liquid chromatography (HPLC), low pressure liquid chromatography (LPLC) และ capillary zone electrophoresis (CZE)⁽⁹⁾ โดยมีรายงานการนำเครื่องตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติมาใช้ในการวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่เสี่ยงเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในประเทศไทยแล้ว 2 ระบบ คือ HPLC⁽⁷⁾ และ CZE⁽⁶⁾ แต่สำหรับระบบ LPLC ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน ประกอบกับที่หน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตัวอย่างเลือดทารกในครรภ์มารดาทุกตัวอย่างที่ส่งเข้าไปรับบริการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจะได้รับการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติทั้งระบบ CZE และ LPLC ร่วมกับตรวจวิเคราะห์ยีนอัลฟาและบีตา-ธาลัสซีเมียตามชนิดของความผิดปกติของยีนโกลบินรวมทั้งการตรวจสอบการปนเปื้อนของตัวอย่างแม่ในตัวอย่างทารกด้วยเทคนิค PCR ที่เกี่ยวข้องอยู่แล้ว^(9,10) คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินทารกในครรภ์มารดาด้วยวิธี LPLC เปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เพื่อนำผลการศึกษาที่รวบรวมได้ไปใช้อ้างอิงประกอบการวินิจฉัยทารกในครรภ์มารดาที่เสี่ยงต่อโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง สำหรับโรงพยาบาลที่ใช้เครื่อง LPLC ต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

รวบรวมข้อมูลผลการตรวจเลือดทารกในครรภ์ที่เสี่ยงต่อโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จำนวน 74 ตัวอย่างที่มารับบริการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่หน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2554 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2556 ที่มีผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง

LPLC โดยรวบรวมลักษณะโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินที่ตรวจพบ จำแนกเป็นกลุ่มตามจีโนไทป์ที่สรุปได้จากผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอประกอบการด้วยการตรวจยีน α - thalassemia 1 (SEA & THAI deletions), α - thalassemia 2 (3.7 & 4.2 kb deletions), Hb Constant & Hb Pakse' และ β - thalassemia ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ⁽¹¹⁻¹⁵⁾

ผลการศึกษา

จากการรวบรวมข้อมูลผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินจากลักษณะโครมาโตแกรม ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง LPLC ในตัวอย่างทั้งหมด 74 ตัวอย่าง มี 11 ตัวอย่าง ที่ผลการตรวจดีเอ็นเอสรุปได้ว่าเป็นทารกปกติ ทั้ง 11 ราย มีฮีโมโกลบินเป็นชนิด FA พบปริมาณ Hb F ร้อยละ 88.1 ± 5.3 และ Hb A ร้อยละ 6.6 ± 2.9 ดังแสดงใน **รูปที่ 1** ตัวอย่างที่เหลือ 63 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่มที่มียีนอัลฟา-ธาลัสซีเมีย 23 ตัวอย่าง บีตา-ธาลัสซีเมียและหรือ Hb E 29 ตัวอย่างและ Hb E ที่มียีนอัลฟา-ธาลัสซีเมียร่วมอีก 11 ตัวอย่างรายละเอียดที่ตรวจพบ มีดังนี้

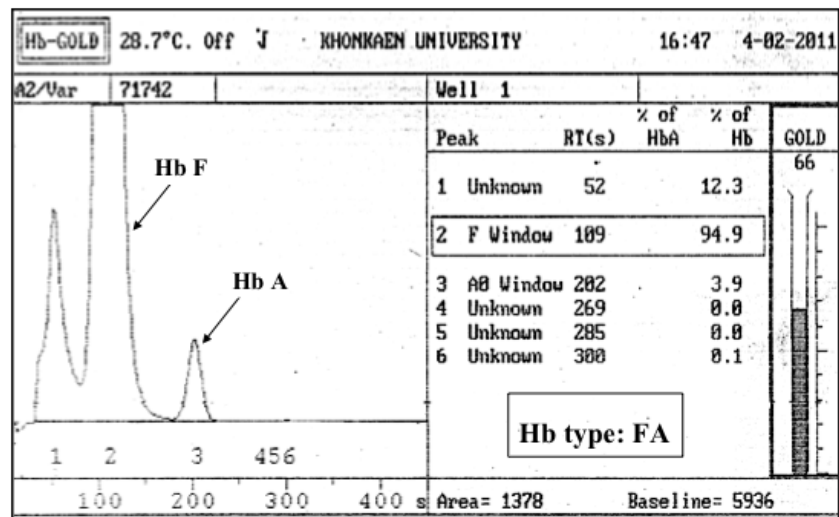
1. กลุ่มตัวอย่างที่มียีนอัลฟา-ธาลัสซีเมีย

ตัวอย่างจำนวน 23 ตัวอย่างที่ตรวจพบยีนอัลฟา-ธาลัสซีเมีย จำแนกตามจีโนไทป์ได้ 8 แบบ แต่ละจีโนไทป์มีผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเทียบกับทารกปกติแสดงใน **ตารางที่ 1** ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินทั้งแบบที่ 1 และ 2 ซึ่งมีอัลฟา-โกลบินยีนผิดปกติไปจำนวน 2 ยีน มีลักษณะเหมือนกัน คือ พบเป็นชนิด FABart's พบปริมาณ Hb Bart's ร้อยละ 9.5 และ 6.4 ตามลำดับ ส่วนแบบที่ 3 และ 4 มีอัลฟา-โกลบินยีนผิดปกติไป 2 ยีนเช่นกัน แต่มี 1 ยีนเป็น Hb Constant Spring ผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินมีลักษณะเหมือนกันคือพบเป็นชนิด CS FABart's มี Hb Bart's ร้อยละ 14.2 - 24.8 (**รูปที่ 2**) แบบที่ 5 , 6 และ 7 มีอัลฟา-โกลบินยีนผิดปกติไป 3 ยีน โดยแบบที่ 5 , 6 ตรวจพบชนิดเป็น CSFABart's เหมือนแบบที่ 3 และ 4 แต่พบปริมาณ Hb Bart's ร้อยละ 43.2 และ 45.0 ตามลำดับ ส่วนแบบที่ 7 พบเป็นชนิด FABart's มีปริมาณ Hb Bart's ร้อยละ 44.3 ส่วนแบบที่ 8 ซึ่งทารกเป็นโรค Hb Bart's hydrop fetalis ตรวจพบ Hb Bart's ปริมาณสูงถึงร้อยละ 99.1 ± 1.7 และไม่พบ Hb F และ Hb A เลย ดังแสดงใน **รูปที่ 3**

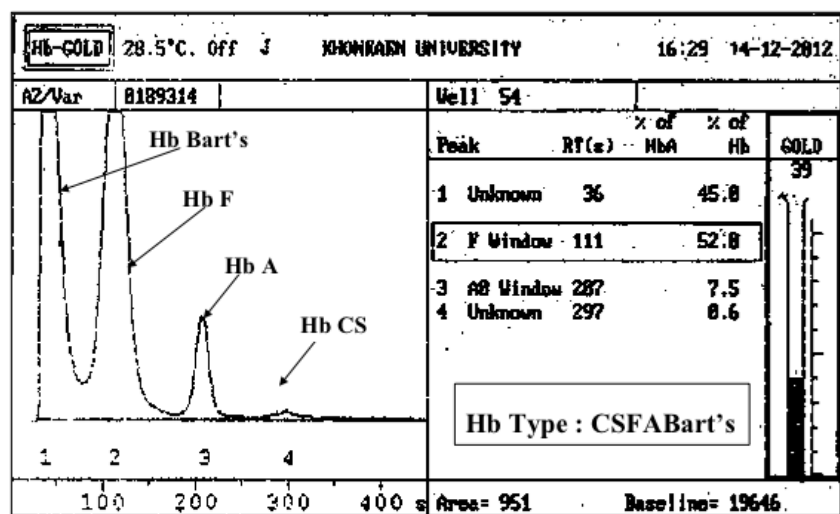
ตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดทารกที่ตรวจพบยีนอัลฟา – ธาลัสซีเมียจำนวน 23 ราย จำแนกตามจีโนไทป์เปรียบเทียบกับทารกปกติ

Genotype (no.)	Hb analysis by LPLC (%)				
	Hb type	Hb CS	% Hb F	% Hb A	% Hb Bart's
$\alpha\alpha / \alpha\alpha$ (11)	FA		88.1 ± 5.3 (80.6 - 95.3)	6.6 ± 2.9 (2.4 - 13.4)	
-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$ (1)	FABart's		82.7	9	9.5
$-\alpha^{3.7} / -\alpha^{3.7}$ (1)	FABart's		90.7	7.2	6.4
$\alpha^{CS}\alpha / \alpha^{CS}\alpha$ (2)	CSFABart's	0.8 , 1.0	69.3 , 78.8	5.8 , 4.7	14.2 , 23.5
$-\alpha^{3.7} / \alpha^{CS}\alpha$ (1)	CSFABart's	0.8	77.7	5.3	24.8
-- ^{SEA} / $\alpha^{CS}\alpha$ (1)	CSFABart's	0.8	54.2	5.7	43.2
-- ^{SEA} / $\alpha^{PS}\alpha$ (1)	CsFABart's	0.6	52	7.5	45
-- ^{SEA} / $-\alpha^{3.7}$ (1)	FABart's		55.8	5.7	44.3
-- ^{SEA} / -- ^{SEA} (15)	Bart's				99.1 ± 1.7 (98.4 - 100)

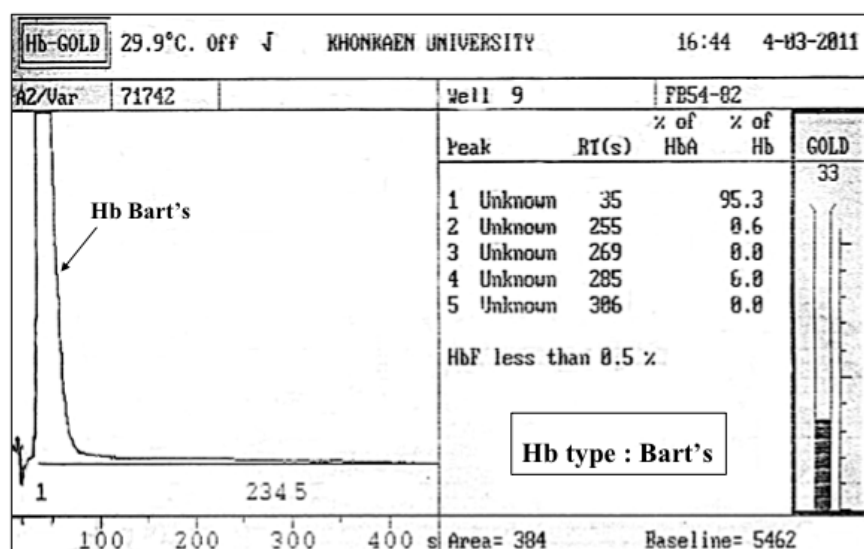
ตัวเลขในตารางแสดงค่าจริงที่ตรวจพบหรือค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)



รูปที่ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของทารกปกติ [$\alpha\alpha / \alpha\alpha, \beta^A / \beta^A$]



รูปที่ 2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของทารกที่เป็น α - thalassemia 1 / Hb Constant Spring [$--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$]



รูปที่ 3 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของทารกที่เป็น homozygous α - thalassemia 1 [$--^{SEA}/--^{SEA}$]

2. กลุ่มตัวอย่างที่มียีนบีตา-ธาลัสซีเมียและหรือ Hb E

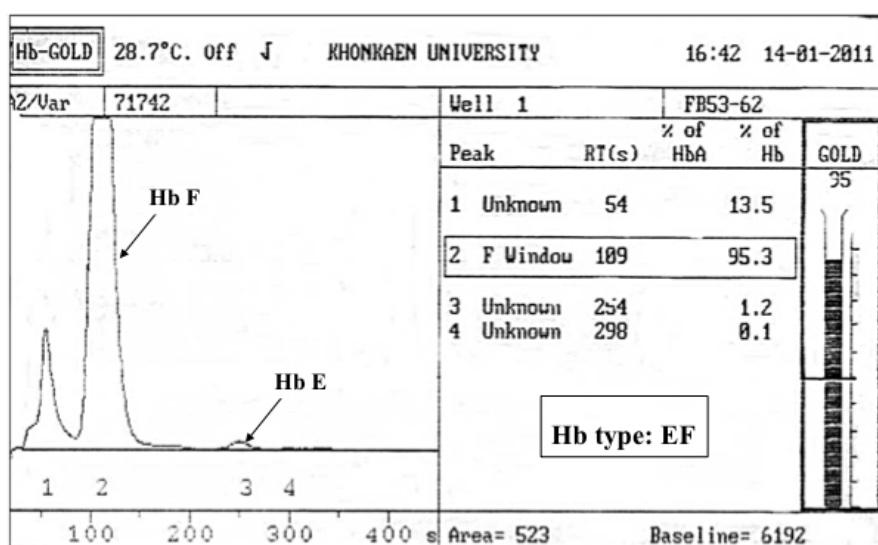
ตัวอย่างจำนวน 29 ตัวอย่างที่ตรวจพบยีนบีตา-ธาลัสซีเมียและหรือ Hb E จำแนกตามจีโนไทป์ได้ 4 แบบ แต่ละจีโนไทป์มีผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินแสดงไว้ใน ตารางที่ 2 โดยทารกที่เป็นพาหะ Hb E ตรวจพบ Hbs E, F และ A ปริมาณร้อยละ 0.9 ± 0.3 , 86.9 ± 9.0 และ 4.2 ± 2.5 ตามลำดับ ส่วน homozygous Hb E พบเป็นชนิด EF ปริมาณ Hb

E ร้อยละ 2.0 และ Hb F ร้อยละ 93.8 ไม่พบ Hb A พาหะ β^0 - thalassemia ตรวจพบเป็นชนิด FA เหมือนคนปกติ โดยพบปริมาณ Hb F และ Hb A ร้อยละ 89.6 ± 6.0 และ 3.2 ± 0.6 ตามลำดับ และในทารกที่เป็นโรค β^0 - thalassemia / Hb E ตรวจพบเป็นชนิด EF มีปริมาณ Hb E ร้อยละ 1.1 ± 0.2 และ Hb F ร้อยละ 95.2 ± 1.1 ตามลำดับ และไม่พบ Hb A ดังแสดงไว้ใน รูปที่ 4 และ รูปที่ 5

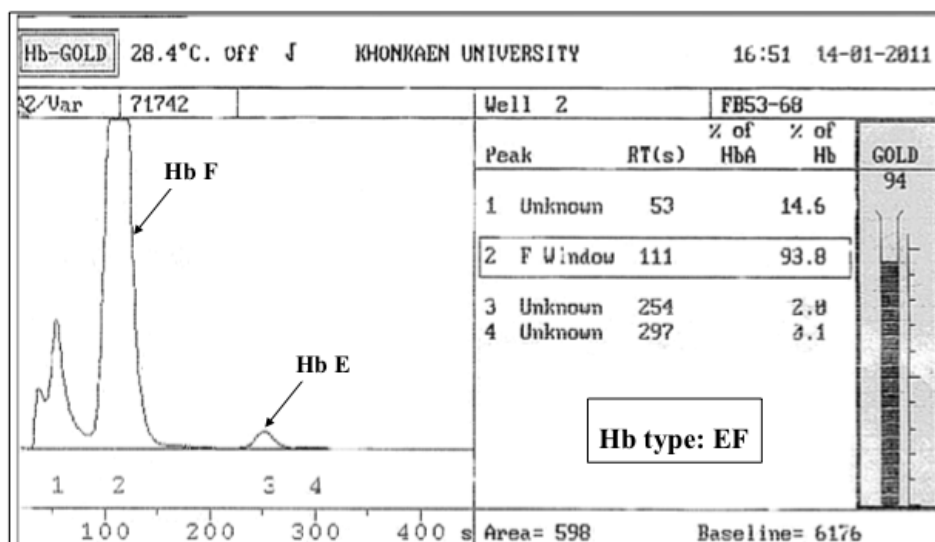
ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดทารกที่ตรวจพบยีนบีตา - ธาลัสซีเมียและหรือ Hb E จำนวน 29 ตัวอย่าง จำแนกตามจีโนไทป์เปรียบเทียบกับทารกปกติ

Genotype (no.)	Hb analysis (%)			
	Hb type	Hb A2 / E	Hb F	Hb A
β^A / β^A (11)	FA		88.1 ± 5.3 (80.6 - 95.3)	6.6 ± 2.9 (2.4 - 13.4)
β^E / β^A (11)	EFA	0.9 ± 0.3 (0.4 - 1.3)	86.9 ± 9.0 (62.7 - 93)	4.2 ± 2.5 (2.5 - 10)
β^E / β^E (1)	EF	2	93.8	
β^0 / β^A (6)	FA		89.6 ± 6.0 (81.7 - 94.6)	3.2 ± 0.6 (2.5 - 3.7)
β^0 / β^E (11)	EF	1.1 ± 0.2 (0.5 - 1.5)	95.2 ± 1.1 (92.8 - 96.8)	

ตัวเลขในตารางแสดงค่าจริงที่ตรวจพบหรือค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)



รูปที่ 4 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของทารกที่เป็น β^0 - thalassemia / Hb E [β^0 / β^E]



รูปที่ 5 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของทารกที่เป็น homozygous Hb E [β^E / β^E]

3. กลุ่มตัวอย่างที่มี Hb E ร่วมกับอัลฟา-ธาลัสซีเมีย

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินในกลุ่มตัวอย่างที่มี Hb E ร่วมกับ อัลฟา-ธาลัสซีเมียซึ่งจำแนกตามจีโนไทป์ที่ตรวจพบได้ 7 แบบ โดยแบบที่ 1 และ 2 มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EFA ส่วนแบบที่ 3 พบเป็นชนิด CSEFA ทั้ง 3 แบบไม่พบ Hb Bart's ส่วนแบบที่ 4 และ 5

พบ Hb Bart's ร้อยละ 15.2 ± 8.7 และ 27.1 ตามลำดับสำหรับแบบที่ 6 ซึ่งเป็นโรค β^0 - thalassemia / Hb E ร่วมกับ α -thalassemia 2 พบเป็นชนิด EF ไม่พบ Hb Bart's และแบบที่ 7 ซึ่งเป็นโรค β^0 - thalassemia / Hb E ร่วมกับ α -thalassemia 1 พบเป็นชนิด EFBart's ปริมาณ Hb Bart's ร้อยละ 25.4

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดทารกที่มี Hb E ร่วมกับยีนอัลฟาธาลัสซีเมียจำนวน 11 ตัวอย่าง จำแนกตามจีโนไทป์เปรียบเทียบกับทารกปกติ

Genotype (no.)	Hb analysis (%)					
	Hb type	CS	A2/E	F	A	Bart's
$\alpha\alpha / \alpha\alpha$ β^A / β^A (11)	FA			88.1 ± 5.3 (80.6 - 95.3)	6.6 ± 2.9 (2.4 - 13.4)	
$-\alpha^{3.7} / \alpha\alpha$ β^E / β^A (2)	EFA		0.9,0.9	81.6,82.4	2.7,2.8	
$-\alpha^{4.2} / \alpha\alpha$ β^E / β^A (1)	EFA		1.3	89.1	3.5	
$\alpha^{CS}\alpha / \alpha\alpha$ β^E / β^A (1)	CS?EFA	0.5	0.8	87.8	2.4	
$-\alpha^{3.7} / \alpha^{CS}\alpha$ β^E / β^A (1)	CSEFABart's	1	0.7	68.5	2.7	27.1
$--^{SEA} / \alpha\alpha$ β^E / β^A (4)	EFABart's		0.9 ± 0.3 (0.6 - 1.3)	84.4 ± 8.2 (75.6 - 95.2)	3.6 ± 0.8 (2.7 - 4.3)	15.2 ± 8.7 (8.9 - 27.7)
$-\alpha^{3.7} / \alpha\alpha$ $\beta^E / \beta^{41/42}$ (1)	EF		1	93.3		
$--^{SEA} / \alpha\alpha$ $\beta^E / \beta^{41/42}$ (1)	EFBart's		1.3	82.4		25.4

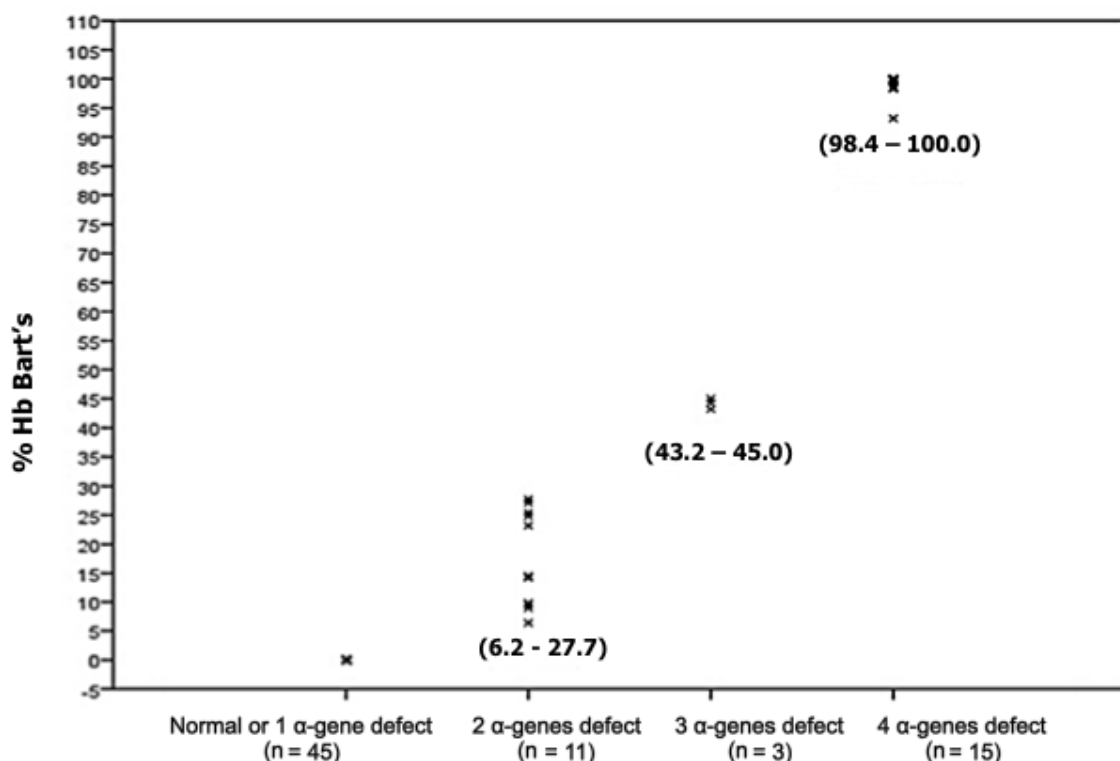
ตัวเลขในตารางแสดงค่า จริ่งที่ตรวจพบหรือค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการรวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินของตัวอย่างเลือดทารกที่เสี่ยงต่อโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติระบบ LPLC จำนวน 74 ตัวอย่าง พบเป็นทารกปกติ 11 ตัวอย่าง มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น FA โดยมีปริมาณ Hb A ที่ตรวจพบด้วยเครื่อง LPLC ร้อยละ 6.6 ± 2.9 (2.4 - 13.4) ใกล้เคียงกับที่มีรายงานด้วยเครื่อง CZE⁽⁶⁾ และ HPLC^(7,16) ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 3.5 - 7.2 และ 3 - 10 ตามลำดับ

ในกลุ่มตัวอย่างที่มียีนอัลฟา-ธาลัสซีเมียผิดปกติไปจำนวน 2 ยีน ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LPLC พบ Hb Bart's ร้อยละ 6.4 - 24.8 โดยพบว่าปริมาณ Hb Bart's ที่ตรวจพบแปรผันตามจำนวนยีนอัลฟาโกลบินที่ผิดปกติ ดังแสดงใน **รูปที่ 6** และหากยีนที่ผิดปกติไปนั้นเป็น Hb Constant Spring มีแนวโน้มจะพบปริมาณ Hb Bart's มากกว่าร้อยละ 10 ส่วนในตัวอย่างทารกที่มีอัลฟาโกลบินยีนผิดปกติไป 3 ยีน ตรวจพบ Hb Bart's ร้อยละ 43.2 - 45.0

ซึ่งสูงกว่าที่ตรวจพบด้วยเครื่อง CZE ซึ่งพบร้อยละ 22.1 - 35.7⁽⁶⁾ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ peak ของ Hb Bart's ถูกรวมอยู่กับ peak ของ glycated Hb F ดังแสดงใน **รูปที่ 2** ทำให้ปริมาณ Hb Bart's ที่ตรวจวัดได้มีค่าสูงกว่าที่รายงานโดยเครื่อง CZE ซึ่ง Hb Bart's จะแยกออกจากฮีโมโกลบินตัวอื่นอย่างชัดเจน การรายงานปริมาณ Hb Bart's จากเครื่อง LPLC จึงต้องพิจารณาค่า retention time ร่วมกับลักษณะโครมาโตแกรมเพื่อประเมินความถูกต้องของปริมาณ Hb Bart's ด้วยทุกครั้ง ส่วนทารกที่เป็นโรค Hb Bart's hydrops fetalis ซึ่งในรายงานนี้พบ 15 ตัวอย่าง มีลักษณะโครมาโตแกรมจากเครื่อง LPLC พบมีลักษณะจำเพาะที่สามารถให้การวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง โดยพบเฉพาะ Hb Bart's ไม่พบ Hb F และ Hb A เลย ปริมาณ Hb Bart's มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 99.1 ± 1.7 สูงกว่าที่ตรวจด้วยเครื่อง CZE ซึ่งพบปริมาณร้อยละ 80 - 81.3 ที่เหลือเป็น embryonic Hb อื่นๆ เช่น Hb Portland, Hb Gower I, Epsilon 4 รวมทั้ง Hb H ซึ่งในเครื่อง LPLC ตรวจไม่พบ เพราะไม่แยกออกจาก Hb Bart's ชัดเจน



รูปที่ 6 ปริมาณ Hb Bart's ในทารกที่มีความผิดปกติของยีนอัลฟา-โกลบิน

สำหรับในกลุ่มบีตา - ธาลัสซีเมีย 29 ตัวอย่าง พบว่าเป็น β^0 - thalassemia / Hb E จำนวน 11 ตัวอย่าง มี Hb เป็น EF ลักษณะโครมาโตแกรมพบ peak ของ Hb E ปริมาณร้อยละ 1.1 ± 0.2 Hb F ปริมาณ ร้อยละ 95.2 ± 1.1 ไม่พบ peak ของ Hb A เลย แต่จะพบปริมาณ Hb A ร้อยละ 6.6 ± 2.9 , 4.2 ± 2.5 และ 3.2 ± 0.6 ในทารกปกติ, heterozygous Hb E และ heterozygous β^0 - thalassemia ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Srivorakul H และคณะ⁽⁶⁾ ที่ศึกษาด้วยเครื่อง CZE ซึ่งพบปริมาณ Hb A ร้อยละ 4.3 - 7.2, 1.0 - 5.5 และ 2.1 - 3.9 ตามลำดับ และไม่พบ Hb A เลยใน β^0 - thalassemia / Hb E เช่นกัน ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ลักษณะโครมาโตแกรม ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินที่พบจากเครื่อง LPLC ในการช่วยวินิจฉัยธาลัสซีเมียชนิด β^0 - thalassemia / Hb E ได้ แต่ต้องมีความระมัดระวังในการแปลผล เนื่องจากตัวอย่างที่เป็น homozygous Hb E ดังแสดงใน รูปที่ 5 มีผลการตรวจ Hb เป็น EF มีปริมาณ Hb E เท่ากับร้อยละ 2.0 Hb F ร้อยละ 93.8 ซึ่งอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับ β^0 - thalassemia / Hb E ดังนั้นในกรณีที่ทั้งหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสมี Hb E ทั้งคู่ โดยที่ฝ่ายหนึ่งเป็น β^0 - thalassemia / Hb E ทารกในครรภ์จะมีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นได้ทั้ง β^0 - thalassemia / Hb E และ homozygous Hb E การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเพียงอย่างเดียวไม่ว่าจะใช้ระบบ LPLC, CZE⁽⁶⁾ หรือ HPLC^(7,17) ผลการตรวจที่พบชนิด EF โดยไม่พบ Hb A จะยังสรุปไม่ได้ ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอก่อน อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ด้วยเครื่อง LPLC นี้ สามารถให้การวินิจฉัยส่วนทารกที่มี Hb E ได้ทุกราย โดยพบ Hb E ได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.7 - 1.3 ในพาหะ Hb E และร้อยละ 2 ในผู้ที่ เป็น homozygote

กลุ่มพาหะ Hb E มียืนแฝงอัลฟา - ธาลัสซีเมีย 11 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้ 4 ตัวอย่าง มีความผิดปกติของยืนอัลฟา - โกลบินยืนเดียว ทั้ง 4 ตัวอย่างตรวจไม่พบ Hb Bart's ในขณะที่การศึกษาด้วยเครื่อง CZE⁽⁶⁾ ตรวจพบ Hb Bart's ได้ร้อยละ 1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ Hb Bart's มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับ glycated Hb F เครื่อง LPLC จึงไม่รายงานออกมา ส่วนอีก 5 ตัวอย่างที่ยืนอัลฟา - โกลบินผิดปกติไป 2 ยืน ตรวจพบ Hb Bart's ทุกรายและพบปริมาณที่สูงกว่าที่ตรวจพบด้วยเครื่อง CZE⁽⁶⁾ สำหรับอีก 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น β^0 - thalassemia / Hb E 1 ตัวอย่าง มียืนแฝง

α - thalassemia 1 ตรวจพบ Hb Bart's ร้อยละ 25.4 ส่วนอีก 1 ตัวอย่างมียืนแฝง α - thalassemia 2 ตรวจไม่พบ Hb Bart's ดังนั้นการตรวจพบ Hb Bart's ในตัวอย่างเลือดทารกเมื่อตรวจด้วยเครื่อง LPLC จึงบ่งชี้ว่าทารกที่มียืนอัลฟา-ธาลัสซีเมียผิดปกติตั้งแต่ 2 ยืนขึ้นไปดังแสดงใน รูปที่ 6 คล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Srivorakul H และคณะ ที่ศึกษาด้วยเครื่อง CZE⁽⁶⁾

โดยสรุป การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องอัตโนมัติ LPLC สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของทารกในครรภ์ คือ โรค homozygous α^0 - thalassemia (Hb Bart's hydrops fetalis) ได้ สำหรับโรค β^0 - thalassemia / Hb E นั้น มีลักษณะของ Hb ที่ตรวจพบคล้ายกับ homozygous Hb E หากทารกในครรภ์มีความเสี่ยงต่อ homozygous Hb E ด้วย จำเป็นต้องได้รับการตรวจยืนบีตา-ธาลัสซีเมียและ Hb E เพื่อวินิจฉัยแยกทั้งสองภาวะออกจากกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndrome. 3rd ed. London : Blackwell Scientific Publication, 1981
2. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 1987; 11: 65-8.
3. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairoam V, Siriboon W, Siritanaratkul N, Kanokpongsakdi S, et al. Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: experience from 100 pregnancies. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991; 22: 16-29.
4. Ratanasiri T, Charoenthong C, Komwilaisak R, Changtrakul Y, Fucharoen S, Wongkham J, et al. Prenatal prevention for severe thalassemia disease at Srinagarind Hospital. J Med Ass Thai 2006; 89: 87-93.
5. Yamsri S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Ratanasiri T, Fucharoen S. Prevention of severe thalassemia in northeast Thailand: 16 years of experience at a single university center. Prenat

- Diagn 2010; 30: 540-6.
6. 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.
 7. 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.
 8. สุพรรณ ฟุเจริญ, กุลนภา ฟุเจริญ. การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมียด้วยวิธี capillary electrophoresis: ประสพการณ์จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2554; 23: 213-24.
 9. กุลนภา ฟุเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2552: 85-95.
 10. สุพรรณ ฟุเจริญ. ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทย: แนวทางการตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุล. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2554; 23: 1-6.
 11. Sae-ung N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Alpha(0)-thalassemia and related disorders in northeast Thailand: a molecular and hematological characterization. *Acta Haematol* 2007; 117: 78-82.
 12. Boonsa S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Wiangnon S, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. The diverse molecular basis and hematological features of Hb H and AE Bart's diseases in Northeast Thailand. *Acta Haematol* 2004; 111: 149-54.
 13. Fucharoen S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Pengjam Y. Molecular analysis of a Thai beta-thalassaemia heterozygote with normal haemoglobin A2 level: implication for population screening. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 44 - 9.
 14. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Hb Paksé [(alpha2) codon142 (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, Panayasai S, Devenish R, Luy L. Interaction of hemoglobin E and several forms of alpha-thalassemia in Cambodian families. *Haematologica* 2003; 88: 1092-8.
 16. Sanguansermisri T, Thanaratanakorn P, Steger HF, Tongsong T, Sirivatanapa P, Wanapirak C, et al. Prenatal diagnosis of hemoglobin Bart's hydrops fetalis by HPLC analysis of hemoglobin in fetal blood samples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32: 180-5.
 17. Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguansermisri T. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia/Hb E by hemoglobin typing compared to DNA analysis. *Hemoglobin*. 2009; 33: 17-23.