ความชุกและปัญหาของชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติในกลุ่มประชากรของจังหวัดลำปาง

Prevalence and problem of hemoglobinopathy in the population of Lampang Province

เทียมจันทร์ เกี่ยวการค้า*
Tiemjan Keowkarnkah*

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำปาง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง 52000
Division of Medical Technology, Lampang hospital, Lampang, 52000 Thailand.

** ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: tiemjan_k@hotmail.com)*
** Corresponding author (Email: tiemjan_k@hotmail.com)*
Received July 12, 2557
Accepted as revised July 25, 2557

Abstract

Objectives: To determine prevalence and problem of abnormal hemoglobins (Hbs) on interpreting hemoglobin (Hb) identification results in Lampang hospital.

Materials and methods: PCR was performed to identify globin gene defects in 102 from 14,909 routine blood samples failed to identify types and quantities of Hbs by cation-exchange low pressure liquid chromatography (LPLC).

Results: Prevalence of abnormal Hb was 0.68%. These abnormal Hbs could interfere with chromatogram interpretation. Hemoglobin (Hb) peak residing around F window was Hb Hope (71.6%). Hb peak localized around S window was Hb Tak (13.7%) and Hb Q-Thailand (10.8%). Hb peaks residing after HbA_2, at Hb Constant Spring window, were Hb A_2-Melbourne (2.9%) and Hb A_2-Lampang (0.98%). These abnormal Hbs were seen in both single form and combinations with α and β-thalassemia with alterations of hematological parameters.

Conclusion: Incidence of abnormal Hbs in Lampang was rare but may interfere with interpretation of Hb identification performed by cation-exchange LPLC. Consideration of hematological parameters and globin gene defects were necessary to obtain correct interpretation.

Keywords: Hemoglobin typing, abnormal hemoglobin, molecular analysis, low pressure liquid chromatography

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อวิเคราะห์ความชุกและปัญหาของฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีต่อการแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในโรงพยาบาลลำปาง

วัสดุและวิธีการ: ทำการตรวจความผิดปกติของยีนโกลบินด้วยวิธีพีซีอาร์ในตัวอย่างเลือดที่ตรวจในงานประจำวันจำนวน 102 รายจากทั้งหมด 14,909 รายที่ไม่สามารถแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธี cation-exchange low pressure liquid chromatography (LPLC)

ผลการศึกษา: ความชุกของฮีโมโกลบินผิดปกติคือ 0.68% แต่อาจรบกวนการแปลผลการตรวจจากโครมาโตแกรม ฮีโมโกลบินที่อยู่บริเวณ F window คือ Hb Hope (71.6%) ฮีโมโกลบินที่อยู่บริเวณ S window คือ Hb Tak (13.7%) และ Hb Q-Thailand (10.8%) และฮีโมโกลบินที่อยู่บริเวณหลัง HbA_2 และตรงกับบริเวณ Hb Constant Spring window คือ Hb A_2-Melbourne (2.9%) และ A_2-Lampang (0.98%) โดยพบทั้งชนิดเดี่ยวและอยู่ร่วมกันกับแอลฟ่าและบีต้าธาลัสซีเมียโดยมีการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยา

สรุปผลการศึกษา: ความชุกของฮีโมโกลบินผิดปกติในจังหวัดลำปางไม่สูง แต่สามารถรบกวนการแปลผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี cation-exchange LPLC ได้ การพิจารณาค่าทางโลหิตวิทยาและความผิดปกติของยีนโกลบินเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อความถูกต้องของการแปลผล

คำรหัส: การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน ฮีโมโกลบินผิดปกติ การวิเคราะห์ระดับโมเลกุล Low pressure liquid chromatography

บทนำ

ฮีโมโกลบินผิดปกติ (abnormal hemoglobins or hemoglobin variants) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดความผิดปกติของสายโกลบินในโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ปัจจุบันทั่วโลกพบฮีโมโกลบินผิดปกติไม่น้อยกว่า 1,000 ชนิด[1] สำหรับในประเทศไทยพบไม่น้อยกว่า 20 ชนิด[2] เช่น ฮีโมโกลบิน อี (HbE) ฮีโมโกลบิน คอนสแตนสปริง (Hb Constant Spring; CS) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินที่พบได้บ่อยในโครงการตรวจหาธาลัสซีเมียของไทย[3,4] นอกจากนี้ยังพบฮีโมโกลบินผิดปกติอื่นๆ ที่พบได้ไม่บ่อยเช่นกัน ความชุกของฮีโมโกลบินผิดปกติในแต่ละส่วนของโลกแตกต่างกัน ขึ้นกับเชื้อชาติของประชากร และสภาพภูมิศาสตร์ สำหรับในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามพื้นที่แต่ละภาค[5-7] ปัจจุบันมีวิธีตรวจหาฮีโมโกลบินผิดปกติหลายวิธี ได้แก่ cation-exchange high pressure liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) or capillary isoelectric focusing [8-12] และ cation-exchange low pressure liquid chromatography (LPLC)[13]

โรงพยาบาลลำปางเป็นโรงพยาบาลศูนย์ระดับตติยภูมิห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลลำปาง ตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (hemoglobin typing) ด้วยวิธี LPLC จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลลำปาง และโรงพยาบาลอื่นๆ ภายในจังหวัดลำปาง โดยมีจำนวนเฉลี่ยปีละประมาณ 3,000 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีโอกาสสูงที่จะตรวจพบ peak ของฮีโมโกลบินผิดปกติที่ไม่สามารถอ่านและแปลผลตรวจได้ทันที จึงต้องส่งตรวจต่อด้วยวิธีการระดับโมเลกุล เช่น polymerase chain reaction (PCR) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและปัญหาของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ ในจังหวัดลำปาง เพื่อใช้ข้อมูลเป็นกลไกกระตุ้นให้เกิดความตระหนักในการแปลผล hemoglobin typing ของตัวอย่างเลือด และเพื่อสร้างรูปแบบการจัดการตัวอย่างเลือดที่มีผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินผิดปกติ ทั้งนี้เพื่อให้ได้แนวปฏิบัติที่เหมาะสมเพื่อทำให้การรายงานผลตรวจ hemoglobin typing มีความถูกน่าเชื่อถือ และเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการวินิจฉัยโรคทางโลหิตวิทยา

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

คัดเลือกตัวอย่างเลือด 102 ราย จากทั้งหมด 14,909 รายที่ถูกส่งมาตรวจ hemoglobin typing ด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ (Hb Gold analyzer, Drew Scientific, England) ที่เปิดให้บริการในงานประจำวันของโรงพยาบาลลำปาง ระหว่างเดือนเมษายน 2553 ถึงเดือนพฤษภาคม 2557 ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลตรวจ hemoglobin typing ที่มีลักษณะโครมาโตแกรม

แตกต่างไปจากที่พบในคนปกติ ได้แก่ พบ peak ที่ตรงตำแหน่ง S-window หรือมีลักษณะโครมาโตแกรมที่ไม่สอดคล้องกับผลการตรวจทางโลหิตวิทยา ได้แก่ พบ peak ที่ตำแหน่ง F-window หรือ ตำแหน่งใกล้กับฮีโมโกลบิน Constant Spring (Hb CS) แต่มีค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงค่อนข้างปกติ ซึ่งไม่บ่งชี้ว่าเกี่ยวข้องกับธาลัสซีเมีย

2. ขั้นตอนการศึกษา

จัดส่งตัวอย่างเลือดทั้ง 102 ราย พร้อมทั้งผลการตรวจ complete blood count (CBC) และผลการตรวจ Hb typing ไปที่บริษัท พีซีที แลบบอราตอรี่ เซอร์วิส จำกัด จำนวน 54 ราย และอีก 48 ราย ส่งไปที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติในระดับโมเลกุล ด้วยเทคนิค allele specific PCR หรือ direct DNA sequencing

3. จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับอนุญาตให้ดำเนินการศึกษาจากคณะกรรมการวิจัยของโรงพยาบาลลำปาง ตามบันทึกข้อความที่ ลป 0027.120/222 ลงวันที่ 4 กรกฎาคม 2550

ผลการศึกษา

ความชุกและลักษณะของฮีโมโกลบินผิดปกติ

ผลจากการวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนแอลฟ่าโกลบินและบีต้าโกลบินในตัวอย่างที่เป็นปัญหาทั้ง 102 รายพบว่าเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหมด คิดเป็นความชุกเท่ากับ 0.68% ประกอบด้วย ฮีโมโกลบินโฮป (Hb Hope) 73 ราย (71.6%) ฮีโมโกลบินตาก (Hb Tak) 14 ราย (13.7%) ฮีโมโกลบินคิวไทยแลนด์ (Hb Q-Thailand) 11 ราย (10.8%) ฮีโมโกลบินเอทูเมลเบอร์น (Hb A_2-Melbourne) 3 ราย (2.9%) และ ฮีโมโกลบินเอทูลำปาง (Hb A_2-Lampang) 1 ราย (0.98%) ดังแสดงใน Table 1 เมื่อวิเคราะห์แยกตามตำแหน่งการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 5 ชนิดบนโครมาโตแกรม พบว่าฮีโมโกลบินผิดปกติเหล่านี้มีการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับฮีโมโกลบินปกติ กล่าวคือ Hb Hope เคลื่อนที่ในตำแหน่ง F-window (Figure 1) Hb Tak และ Hb Q-Thailand เคลื่อนที่ในตำแหน่ง S-window (Figure 2 and 3 ตามลำดับ) ขณะที่ Hb A_2-Melbourne และ Hb A_2-Lampang เคลื่อนที่ในตำแหน่งหลัง Hb A_2 (Figure 4 and 5 ตามลำดับ)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนฮีโมโกลบินผิดปกติร่วมกับยีนแอลฟาและ/หรือบีต้าธาลัสซีเมีย

เนื่องจากประชากรภาคเหนือของไทยมีความชุกของ α-thalassemia และ β-thalassemia ค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์หายีนของ α-thalassemia และของ β-thalassemia ในตัวอย่างที่มีปัญหาทั้ง 102 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลพบว่ายีนของฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 5 ชนิดมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกับยีนแอลฟ่าและ/หรือบีต้าธาลัสซีเมียด้วย ทำให้ฮีโมโกลบินผิดปกติที่ตรวจพบแต่ละชนิดมีจีโนทัยป์และรูปแบบของฮีโมโกลบินที่หลากหลาย (Table 1) โดยกลุ่มที่เป็น Hb Hope มี 9 จีโนทัยป์ กลุ่ม Hb Tak มี 4 จีโนทัยป์ กลุ่มที่เป็น Hb Q-Thailand พบ 4 จีโนทัยป์ กลุ่มที่เป็น Hb A_2-Melbourne พบ 3 จีโนทัยป์ และ Hb A_2-Lampang พบ 1 จีโนทัยป์ โดยผลการอ่าน Hb typing เริ่มแรกของกลุ่ม Hb Hope มี HbF ประกอบทุกจีโนทัยป์ กลุ่ม Hb Tak และ HbQ-Thailandมี HbSประกอบทุกจีโนทัยป์และกลุ่ม Hb A_2-Melbourne และ Hb A_2-Lampang อ่านผลเป็น Hb Constant Spring ทุกจีโนทัยป์ อนึ่งการมีปฏิสัมพันธ์กับ α-thalassemia และ β-thalassemia ไม่ทำให้การเคลื่อนที่หรือ retention time ของฮีโมโกลบินผิดปกติเปลี่ยนแปลงไป

ข้อมูลทางโลหิตวิทยาของพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติ

ข้อมูลทางโลหิตวิทยาของพาหะ Hb Hope 49 ราย พาหะ Hb Tak 7 ราย และ พาหะ Hb Q-Thailand 8 ราย เปลี่ยนแปลงไปจากค่าอ้างอิงเล็กน้อย (Table 2) และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางโลหิตวิทยาของพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 3 ชนิด พบว่าค่าทางโลหิตวิทยาและดัชนีเม็ดเลือดแดงทุกชนิด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (Table 2) โดยค่า MCV ในพาหะ Hb Tak และพาหะ Hb Q-Thailand มีแนวโน้มต่ำกว่าค่า MCV ในพาหะ Hb Hope ในขณะที่พาหะ Hb Hope มีค่า RDW ต่ำที่สุด อนึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างพาหะ Hb Tak กับพาหะ Hb Q-Thailand ซึ่ง Hb Tak และ Hb Q-Thailand เคลื่อนที่ในตำแหน่ง S- window เหมือนกัน พบว่าค่า Hb, Hct, RBC count, และ MCHC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนค่า MCV, MCH, และ RDW-CV ไม่ต่างกัน

วิจารณ์ผลการศึกษา

ฮีโมโกลบินผิดปกติพบได้ทั่วโลก การกระจายตัวและความชุกขึ้นกับเชื้อชาติของประชากรและสภาพทางภูมิศาสตร์ การศึกษาครั้งนี้พบฮีโมโกลบินผิดปกติ 5 ชนิด โดย 4 ชนิดแรกเป็นชนิดที่เคยมีการรายงานพบในประชากรไทยมาแล้ว[7,14,15] แต่ความชุกที่พบต่างกัน[7] ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Hb Hope เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบมากที่สุดในประชากรจังหวัดลำปาง โดยพบมากถึงร้อยละ 71.6 ของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบ ขณะที่ภาคอื่นของประเทศไทยพบต่ำกว่า[7,15] ข้อมูลนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับใช้ประกอบการวิเคราะห์ผลตรวจ hemoglobin typing ด้วยวิธี LPLC ซึ่งลักษณะโครมาโตแกรมของ Hb Hope จะพบ peak ที่ตำแหน่ง F-window

Table 1. Genotype, combination, hemoglobin type and hematological parameters of 102 abnormal hemoglobin types found.

Hemoglobin variants	n	Hb Type by LPLC	RBC count ($x10^6/\mu L$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)
Hemoglobin Hope ($\beta^{136Gly\rightarrow Asp}$)									
Heterozygous Hb Hope	49	A_2FA	4.1±0.6	12.1±1.4	36.1±4.8	87.5±5.4	29.4±2.5	33.6±1.4	13.2±1.1
Compound heterozygous Hb Hope and Hb E	6	EF	4.1±0.5	10.4±1.2	32.6±3.8	79.4±4.8	25.5±1.2	31.9±1.2	14.0±1.0
Compound heterozygous Hb Hope and β^0-thal	7	A_2F	4.5±0.7	9.0±2.0	28.2±5.8	62.9±5.8	19.8±2.0	31.9±0.6	17.1±2.3
Double heterozygous Hb Hope and α-thal 1 (SEA)	2	A_2FA	4.2±0.2	9.0±0.8	27.9±2.0	67.0±1.6	21.5±0.8	32.1±0.4	19.4±4.2
Double heterozygous Hb Hope and α-thal 2 (3.7 kb)	3	A_2FA	3.3±1.1	7.3±3.3	23.9±9.8	69.9±13.5	21.3±5.2	30.2±1.9	18.6±7.9
Double heterozygous Hb Hope and α-thal 2 (4.2 kb)	1	A_2FA	4.3	10.3	30.2	70.2	23.9	34.1	14.7
Double heterozygous Hb Hope and Hb CS	3	A_2FA	4.2±1.3	10.9±2.8	35.6±11.5	82.8±3.6	26.2±1.6	31.2±2.3	14.5±1.9
Compound heterozygous Hb Hope and β^0-thal and heterozygous α-thal 1 (SEA)	1	A_2F	5.2	12.5	38.5	74.0	24.0	32.4	15.5
Compound heterozygous Hb Hope and β^0-thal and heterozygous α-thal 2 (3.7 kb)	1	A_2F	5.3	10.5	32.3	60.9	19.8	32.3	15.3
Hemoglobin Tak ($\beta^{146\ term\text{-}thr\ AC\ insertion}$)									
Heterozygous Hb Tak	7	SA	5.7±1.4	13.6±4.0	43.2±11.9	76.0±9.5	24.0±4.1	31.4±1.7	16.1±2.6
Compound heterozygous Hb Tak and β^0-thal	5	SF	8.1±1.4	17.4±2.9	56.9±10.0	68.1±7.0	20.8±2.1	30.6±0.8	22.2±3.7
Heterozygous Hb Tak with compound heterozygous α-thal 2 (3.7 kb) and Hb CS	1	SA	5.9	13.7	44.0	74.5	23.2	31.1	15.0
Double heterozygous Hb Tak and α-thal 1 (SEA)	1	SA	5.8	13.6	42.8	73.8	23.4	31.8	15.6
Hemoglobin Q-Thailand ($\alpha^{74Asp\rightarrow His}$)									
Heterozygous Hb Q-Thailand	8	A_2SA	4.4±1.1	11.3±2.8	33.8±8.2	78.0±8.7	26.1±3.6	33.4±1.0	15.4±2.3
Compound heterozygous Hb Q-Thailand and Hb CS	1	A_2SA	4.7	10.5	33.4	71.1	22.3	31.4	16.2
Hb H disease with heterozygous Hb Q-Thailand	1	SHBart's	3.9	8.5	27.8	71.3	21.8	30.5	20.1
Double heterozygous Hb Q-Thailand and Hb E	1	SEA	5.4	12.1	38.7	71.7	22.4	31.3	21.1
Hemoglobin A_2-Melbourne ($\delta^{43GAG\rightarrow AAG}$)									
Heterozygous Hb A_2-Melbourne	1	CS?A_2A	4.8	9.5	30.8	64.2	19.8	30.8	20.6
Heterozygous Hb A_2-Melbourne with heterozygous α-thal 1 (SEA)	1	CS?A_2A	4.6	9.8	30.3	65.8	21.3	32.3	17.0
Heterozygous Hb A_2-Melbourne with heterozygous α-thal 2 (3.7 kb)	1	CS?A_2A	5.5	14.3	43.0	78.0	26.1	33.2	13.2
Hemoglobin A_2-Lampang ($\delta^{47GAT\rightarrow AAT}$)									
Heterozygous Hb A_2-Lampang with heterozygous Hb E and heterozygous α-thal 2 (3.7 kb)	1	CS?EA	5.7	14.9	45	78.9	26.1	33.1	14.9

Reference range of hematological parameters shown as mean±SD are as follow: RBC: male = 5.0±0.5 $x10^6/\mu L$, female: = 4.3±0.5 $x10^6/\mu L$, Hb: male = 15.0±2.0 g/dL, female = 13.5±1.5 g/dL, Hct: male = 45±5%, female = 41±5%, MCV = 92±9 fL, MCH = 29.5±2.5 pg, MCHC 33.0±1.5 g/dL, RDW-CV = 12.8±1.2%

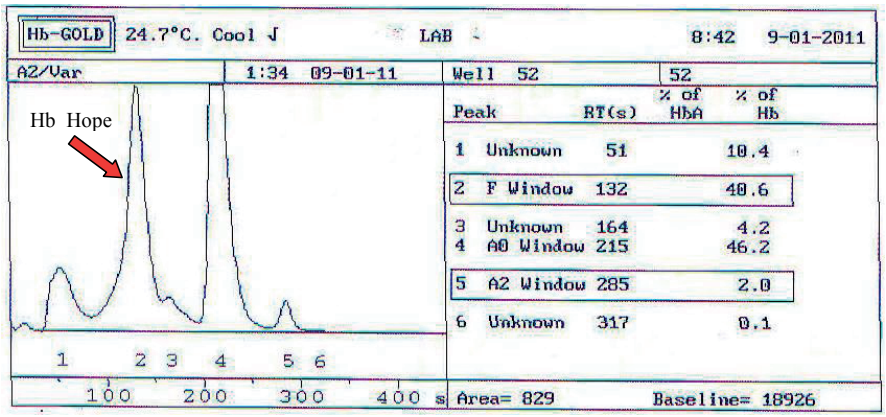

Figure 1. The chromatographic pattern of Hb typing in a sample with Hb Hope which migrate in F-window (by LPLC).

ข้อสังเกตที่ควรสงสัยว่า peak ที่ตำแหน่ง F-window นั้นอาจเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ คือพิจารณาผลตรวจทางโลหิตวิทยาร่วมด้วย โดยปกติโรคบีต้าธาลัสซีเมียชนิด β^0 thalassemia และ β^+ thalassemia จะมีผลตรวจ Hb typing เป็น A_2F และ A_2FA ตามลำดับ แต่ในกรณีที่ผลตรวจ Hb typing ได้ผลเหมือนข้างต้นร่วมกับผลตรวจทางโลหิตวิทยา โดยเฉพาะ MCV และ RDW-CV มีค่าปกติ ในรายงานนี้ ผลตรวจในระดับโมเลกุล พบว่าเป็น Hb Hope (Figure 1, Table 1) นอกจากนี้เมื่อ Hb Hope มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกับ Hb E จะมีผลตรวจ Hb typing เป็น EF ร่วมกับมีค่า MCV และ RDW-CV ปกติเนื่องจากเป็น Hb variants ทั้งคู่ ไม่มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงผิดปกติ (Table 1) ซึ่งต่างจากโรคบีต้าศูนย์ธาลัสซีเมียร่วมกับ Hb E ซึ่งมี Hb typing เป็น EF มีค่า MCV ต่ำกว่าปกติและค่า RDW-CV สูงเสมอ[16] เพราะมีธาลัสซีเมียร่วมด้วยทำให้เม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติมากกว่า ส่วนกรณี Hb Hope มี ปฏิสัมพันธ์ร่วมกับ β^0 thalassemia มีผลตรวจ Hb typing เป็น A_2F ร่วมกับมีค่า MCV ต่ำกว่าปกติ เหมือนกับโรค homozygous β^0 thalassemia แต่ค่า RDW-CV ในโรค homozygous β^0 thalassemia มีค่าสูงเนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลายมากกว่าปกติทำให้มี fragmented red blood cell ในกระแสเลือดจำนวนมาก[17] ในขณะที่ค่า RDW-CV ใน Hb Hope/β^0 thalassemia ปกติ เนื่องจากการกลายพันธ์ของยีนบีต้าโกลบินที่พบใน Hb Hope ไม่ส่งผลต่อการทำหน้าที่ของฮีโมโกลบิน ดังนั้นผู้ที่เป็นพาหะ Hb Hope (heterozygous Hb Hope) จึงไม่แสดงอาการทางคลินิกและค่าทางโลหิตวิทยาไม่เปลี่ยนแปลงไปจากคนปกติ[18] ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยาใน Hb Hope/β^0 thalassemia จึงเกิดจาก β^0 thalassemia ซึ่งโดยทั่วไปพาหะ β^0 thalassemia มักจะทำให้ค่า MCV ลดต่ำลงและค่า RDW สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย[19] ข้อควรระวังในการแปลผลกรณีที่พบ Hb typing เป็น A_2FA, A_2F, EF คือต้องพิจารณาค่าทางโลหิตวิทยา (complete blood count) ประกอบการแปลผลด้วยเสมอ เมื่อพบว่ามีค่า RDW-CV ปกติหรือสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยควรคำนึงถึงการมีฮีโมโกลบินผิดปกติร่วมด้วยโดยเฉพาะ Hb Hope

ส่วนฮีโมโกลบินผิดปกติที่เคลื่อนที่อยู่ในตำแหน่ง S-window ที่พบในการศึกษานี้คือ Hb Tak และ Hb Q-Thailand ข้อมูลทางโลหิตวิทยาเบื้องต้นของฮีโมโกลบินทั้งสองชนิดพบว่าค่า Hb, Hct, RBC count ของพาหะ Hb Tak สูงกว่าพาหะ Hb Q-Thailand (Table 2) ทั้งนี้เนื่องจาก Hb Tak เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีคุณสมบัติจับกับออกซิเจนได้แน่นกว่าปกติ (high oxygen affinity) ทำให้เกิด secondary erythrocytosis ได้ ดังนั้นผู้ที่เป็น heterozygous Hb Tak จึงมักมีค่า Rbc, Hb และ Hct สูงมากกว่าคนปกติ[20] ในขณะที่ Hb Q-Thailand ซึ่งเป็น α-globin variant ที่เกิดการกลายพันธุ์ที่โคดอน 74 ของ α_1-globin gene ร่วมกับการขาดหายไปของดีเอ็นเอขนาด 4.2 kb บนโครโมโซมข้างเดียวกัน การกลายพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้ไม่ส่งผลต่อการทำหน้าที่ของฮีโมโกลบิน ค่า Rbc count, Hb, และ Hb ของผู้ที่เป็น heterozygous Hb Q-Thailand จึงไม่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ[21] ข้อสังเกตลักษณะโครมาโตแกรมของ LPLC คือพบว่า S peak ของ Hb Tak ปรากฏอยู่หลัง A_0 peak โดย retention time คร่อมระหว่าง retention time ของ Hb E และ Hb A_2 และไม่มี Hb A_2 peak คั่นระหว่าง ฮีโมโกลบิน A_0 และฮีโมโกลบิน S (Figure 2) ส่วน Hb Q-Thailand นั้น จะพบ S peak อยู่หลัง Hb A_2 peak เสมอ (Figure 3) ซึ่งเหมือนกับที่เคยมีรายงานในคนไทย[22] ส่วน Hb A_2-Melbourne จะเป็น peak เล็กๆ ที่คมชัดใกล้ตำแหน่ง Hb CS (Figure 4) และ Hb A_2-Lampang มี peak คล้าย Hb A_2-Melbourne แต่ retention time น้อยกว่า Hb A_2-Melbourne (Figure 5)

จากการศึกษาฮีโมโกลบินผิดปกติครั้งนี้ พบว่ามี genotype ทั้งหมดถึง 21 ชนิด (Table 1) เนื่องจากพบการมีปฏิสัมพันธ์ของยีนแอลฟ่าและบีต้าธาลัสซีเมียร่วมด้วย ทำให้ฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดมีลักษณะจีโนทัยป์ที่หลากหลายและนำไปสู่อาการแสดงที่หลากหลายตามไปด้วย รวมถึงการเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางโลหิตวิทยา ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเพียงฮีโมโกลบินผิดปกติเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ เพราะข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงการพบยีนแอลฟ่าและบีต้าธาลัสซีเมียร่วมด้วย (Table 1) ดังนั้นเมื่อพบ peak ฮีโมโกลบินผิดปกติ ร่วมกับมีข้อมูล MCV, MCH

Table 2. Hematological parameters shown as mean±SD and statistical test of difference between Hb Hope, Hb Q-Thailand and Hb Tak.

Hemoglobin variants	Hope trait	Q-Thailand trait	Tak trait	Kruskal-Wallis
Case (n)	**49**	**8**	**7**	***p***
RBC (x10^6/µL); mean ±SD	4.1±0.6	4.4±1.1	6.3±1.5	0.001
Hb (g/dL); mean ±SD	12.1±1.4	11.3±2.8	15.9±3.1	0.002
Hct (%); mean ±SD	36.1±4.8	33.8±8.2	50.2±11.1	0.001
MCV (fL); mean ±SD	87.5±5.4	78.0±8.7	80.3±6.0	0.001
MCH (pg); mean ±SD	29.4±2.5	26.1±3.6	25.6±2.6	0.001
MCHC (g/dL); mean ±SD	33.6±1.4	33.4±1.0	31.8±1.2	0.011
RDW-CV (%); mean ±SD	13.2±1.1	15.4±2.3	15.1±1.4	0.001

Reference range of hematological parameters shown as mean ±SD are as follow: [25] Rbc: male = 5.0±0.5 x10^6/µL, female: = 4.3±0.5 x10^6/µL, Hb: male = 15.0±2.0 g/dL, female = 13.5±1.5 g/dL, Hct: male = 45±5%, female = 41±5%, MCV = 92±9 fL, MCH = 29.5±2.5 pg, MCHC 33.0±1.5 g/dL, RDW-CV = 12.8±1.2%

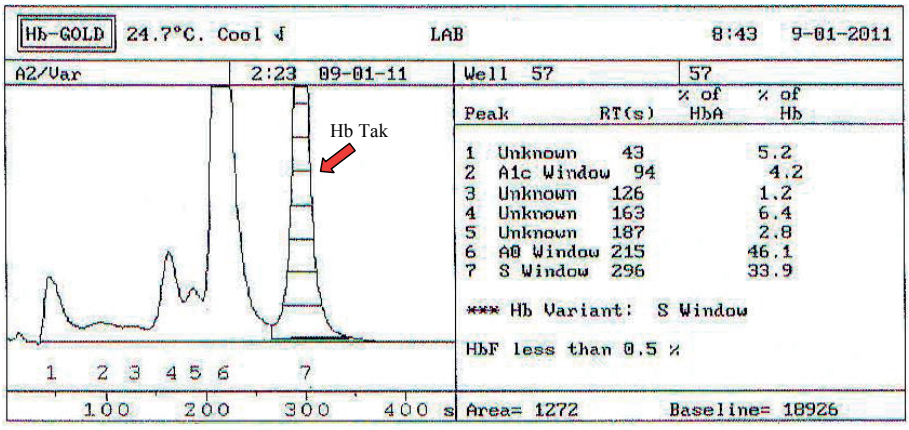

Figure 2. The chromatographic pattern of Hb typing in a sample with Hb Tak which migrate in S-window (by LPLC).

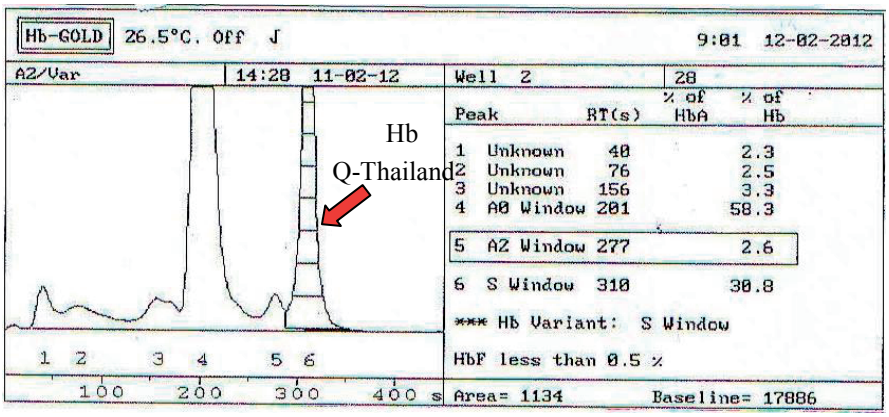

Figure 3. The chromatographic pattern of Hb typing in a sample with Hb Q-Thailand which migrate in S-window (by LPLC).

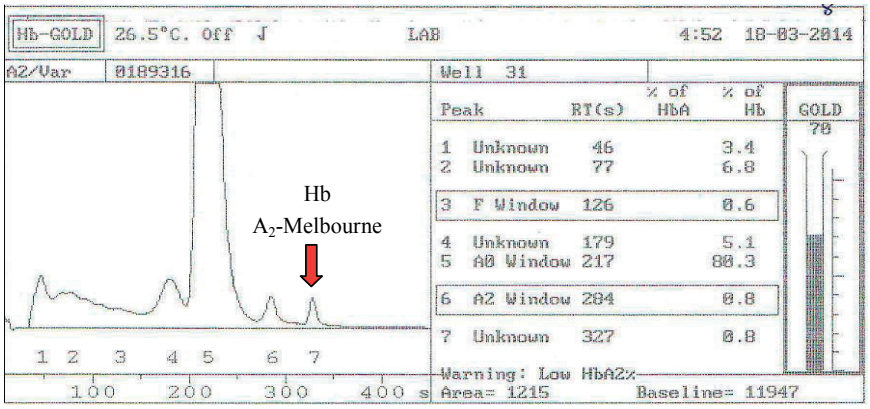

Figure 4. A LPLC chromatogram of Hb typing in a sample with heterozygous HbA_2-Melbourne with heterozygous α-thal 2 (3.7 kb).

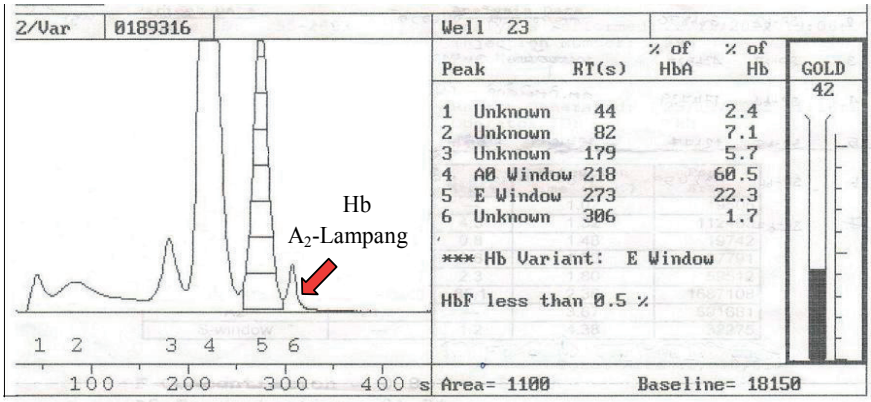

Figure 5. A LPLC chromatogram of Hb typing in a sample with heterozygous HbA_2-Lampang with HbE.

และหรือ RDW-CV ผิดปกติควรมีการตรวจยืนแอลฟ่าหรือยืนบีต้าธาลัสซีเมียควบคู่ไปด้วย โดยเฉพาะในหญิงตั้งครรภ์ที่ตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติ อาจจำเป็นต้องตรวจยืนแอลฟ่าและบีต้าร่วมด้วย เพื่อทราบชนิดและป้องกันการเกิดโรคธาลัสซีเมียรุนแรงในทารกในครรภ์

ในการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี LPLC และแปลผลตรวจนั้น หากผู้ปฏิบัติงานขาดความละเอียดในการอ่านผลและไม่นำค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงมาวิเคราะห์ร่วมกับ chromatogram อย่างละเอียดแล้วจะทำให้รายงานผลผิดพลาดได้ เช่น กรณี Hb Hope หากไม่พิจารณาค่าทางโลหิตวิทยาประกอบ อาจรายงานเป็น Hb F ได้ นอกจากนี้ยังพบ Hb A_2-variants อีก 2 ชนิด ที่เคลื่อนที่อยู่หลัง Hb A_2 โดย Hb A_2-Lampang เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีการรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 โดย Panyasai S และคณะ[23] รวมทั้งการพบ Hb A_2-Melburne ที่มี Peak ใกล้เคียงกับ Hb CS แต่ไม่ใช่ Hb CS จากข้อมูลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจ Hb typing ต้องระมัดระวังการแปลผลมากขึ้น เนื่องจากฮีโมโกลบินผิดปกติมีการตรวจพบมากขึ้นทั้งชนิดที่เคยและไม่เคยมีการรายงานมาก่อน นอกจากนี้ Hb Hope ที่พบสูงถึงร้อยละ 71.6 ซึ่งสูงกว่าในภาคอื่นมาก เมื่อนำมาประมวลกับผลการวิเคราะห์ peak ที่สงสัยกับผลตรวจยืนยัน ทำให้ได้แนวทางว่า ถ้าพบ peak ที่เหมือน Hb F ในการตรวจ Hb typing ด้วยวิธี LPLC และค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงค่อนข้างปกติ ให้ผู้ตรวจตระหนักว่าน่าจะเป็น Hb Hope อย่างไรก็ตาม การตรวจยืนยันระดับโมเลกุลยังมีความจำเป็น การศึกษานี้จึงได้การพิจารณาส่งตรวจยืนยันถึงระดับยีนทั้งแอลฟ่าและบีต้า ถึงแม้ Hb Hope จะมีค่าเฉลี่ยของดัชนีเม็ดเลือดแดงปกติ และไม่มีอาการทางคลินิก[24] รวมทั้ง Hb Tak และ Hb Q-Thailand ที่พบในรายงานนี้ แต่หากมี combination กับฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นอาจเกิดความผิดปกติที่รุนแรงขึ้น ดังนั้น การทราบชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติเหล่านี้และการพบยีนแอลฟ่าและบีต้าร่วม จึงยังมีความสำคัญ ที่จะทำให้ห้องปฏิบัติการรายงานผลถูกต้องที่สุด และเป็นประโยชน์แก่แพทย์ในการวินิจฉัยโรคและวางแผนดูแลรักษาผู้ป่วยทางโลหิตวิทยาให้ถูกต้องต่อไป

สรุปผลการศึกษา

การกระจายของฮีโมโกลบินผิดปกติในจังหวัดลำปางโดยเฉพาะ Hb Hope น่าจะเกี่ยวข้องกับชาติพันธุ์ของประชากรใน

พื้นที่และสภาพภูมิศาสตร์ การพบฮีโมโกลบินผิดปกติจากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้นักเทคนิคการแพทย์ในห้องปฏิบัติการที่ตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี LPLC ตระหนักและระมัดระวังในการอ่านฮีโมโกลบินที่ปรากฏใน F-Window และ S-Window ที่มีลักษณะโครมาโตแกรมผิดปกติ เพื่อไม่ให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผลตรวจ อย่างไรก็ตาม ควรส่งตรวจยืนยันในระดับโมเลกุล เพื่อให้สามารถระบุชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติได้อย่างถูกต้อง และเพื่อสามารถอธิบายพยาธิสภาพที่อาจเกิดกับผู้ที่มีฮีโมโกลบินผิดปกตินั้นได้ ข้อมูลฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบและผลทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วยจากการศึกษานี้ จะทำให้แพทย์ทางโลหิตวิทยาเข้าใจถึงการกระจายของฮีโมโกลบินผิดปกติได้มากขึ้น และมีประโยชน์ในการวางแผนตรวจคัดกรองผู้ป่วยฮีโมโกลบินผิดปกติ รวมถึงการให้คำปรึกษาและแนะนำทางพันธุกรรมได้อย่างถูกต้อง โดยเฉพาะในจังหวัดลำปาง และเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาเรื่องนี้ต่อในพื้นที่ภาคเหนือ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สิทธิชัย ปัญญาใส ที่ให้คำแนะนำทางวิชาการและตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติในระดับโมเลกุลของตัวอย่าง 48 ราย ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และบริษัท พีซีที แลบบอราตอรี่ เซอร์วิส จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์การตรวจในระดับโมเลกุล

เอกสารอ้างอิง

1. http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html (Accessed June 02, 2014).
2. Fucharoen S. Thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: molecular diagnostics. J Med Tech Phy Ther 2011; 23(1): 1-6. (In Thai)
3. Panyasai S, Cheechang S. The efficiency of screening for carriers of severe thalassemia in three community hospitals in Nakhon Si Thammarat province, Thailand. Songkla Med J 2009; 27(1): 61-72. (In Thai)
4. Fucharoen S, Fucharoen G. Laboratory diagnosis of thalassemia in a prevention and control program of Thailand. Songkla Med J 2002; 20: 43–55.
5. Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia and abnormal hemoglobin. Int J Hematol 2002; 76 (Suppl 2): 83-9.
6. Uaprasert N, Settapiboon R, Amornsiriwat S, et al. Diagnostic utility of isoelectric focusing and high performance liquid chromatography in neonatal cord blood screening for thalassemia and non-sickling hemoglobinopathies. Clin Chem Acta 2014; 427: 23-6.
7. Saechan V, Nopparatana Ch, Nopparatana C. Molecular basis and hematological features of hemoglobin variants in Southern Thailand. Int J Hematol 2010; 92: 445-50.
8. Tatu T, Gategasem P, Hathirat P. Hemoglobin typing by high performance liquid chromatography. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; 28(2): 417-23.
9. Mario N, Baudin B, Aussel C, Giboudeau J. Capillary isoelectric focusing and high-performance cation-exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. Clin Chem 1997; 43(11): 2137-42.
10. Jenkins M, Ratnaike S. Capillary electrophoresis of hemoglobin. Clin Chem Lab Med 2003; 41(6): 747-54.
11. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC Retention Time as a Diagnostic Tool for Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies: A Study of 60000 Samples in a Clinical Diagnostic Laboratory. Clin Chem 2004; 50(10): 1736-47.
12. Keren DF, Shalhoub R, Gulbranson R, Hedstrom D. Expression of Hemoglobin Variant Migration by Capillary Electrophoresis Relative to Hemoglobin A_2 Improves Precision. Am J Clin Pathol 2012; 137: 660-4.
13. The committee on hemoglobin typing and quantification. The handbook for hemoglobin typing and quantification. Nonthaburi: Clinical Research Center of Department of Medical Sciences, 2010: 1-10. (In Thai)
14. Chaibunruang A, Fucharoen G, Fucharoen S. First description of a Hb A_2 variant in Thailand. Identification of Hb A_2-Melbourne [$\delta^{43(CD2)Glu \rightarrow Lys}$] in Thai individuals. Hemoglobin 2012; 36(1): 80-4.

15. Khorchai A, Sangkitporn S, Duangrueng S, Yodtup C, Dambua A, ChotchusriA, et al. Characteristic Properties of Hemoglobin Variants by Hemoglobin Separation and Quantitation Analysis. Journal of Health Science 2013; 22: 1042-51. (In Thai)
16. Fucharoen S, Winichagoon P. Clinical and hematologic aspects of hemoglobin E beta-thalassemia. Curr Opin Hematol. 2000; 7: 106-12.
17. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. N Engl J Med. 2005; 353: 1135-46.
18. Uaprasert N, Rojnuckarin P, Settapiboon R, Amornsiriwat S, Sutcharitchan P. Clinical and hematological characteristics of uncommon beta-globin variants in Thailand. Int J Hematol. 2009; 89: 568-71.
19. Yamsri S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-Ung N, Fucharoen S Genotype and phenotype characterizations in a large cohort of β-thalassemia heterozygote with different forms of α -thalassemia in northeast Thailand. Blood Cells Mol Dis. 2011; 47(2): 120-4.
20. Wajcman H, Galacteros F. Hemoglobin with high oxygen affinity leading to erythrocytosis. New variants and new concepts. Hemoglobin. 2005; 29: 91–106.
21. Leung KFS, Ma ESK, Chan AYY, Chan LC. Clinical phenotype of haemoglobin Q-H disease. J Clin Pathol 2004; 57: 81-2.
22. Jindadamrongwech S, Tungbuppha N, Chuncharunee S, Butthep P. Hb Tak and Hb Q-Thailand in Thai patients are S-window hemoglobin variants revealed by high performance liquid chromatography. Hemoglobin. 2010; 34(2): 161-4.
23. Panyasai S, Fucharoen G, Fucharoen S. Abnormal Hemoglobins Found in Upper Northern Thailand (abstract). Thai J Genet 2013; 6(Suppl 1): 397.
24. Minich V, Hill RJ, Khuri PD, Anderson ME. Hemoglobin Hope: A Beta Chain Variant. Blood 1965; 25(5): 830-8.
25. Lewis SM. Reference ranges and normal values. In: Lewis SM, Bain BJ, Bates I (eds). Dacie and Lewis Practical haematology. 10th ed, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006: 14.