

รายงานเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

ไมโครคอลัมน์โครมาโตกราฟีประยุกต์สำหรับ การตรวจวัดระดับ Hb A₂

ทัศนียา จำรัสตันกร*, ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี*, อารีรัตน์ ปัญญาเขียว*

บทคัดย่อ

DEAE Sephadex A50 microcolumn chromatography เป็นวิธีมาตรฐาน สำหรับการตรวจหาระดับ Hb A₂ ในที่นี้เราได้ดัดแปลงวิธีการให้ง่ายขึ้นเพื่อใช้ร่วมในโปรแกรมการตรวจกรองพาหะธาลัสซีเมียในสตรีมีครรภ์ และได้ทดลองศึกษากับกลุ่ม พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะ Hb E และคนปกติ กลุ่มละ 30 ราย ได้ค่า mean \pm S.D = 5.3 \pm 0.18%, 25.7 \pm 1.3% และ 2.9 \pm 0.06% ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าที่ได้จากวิธีการเดิม = 5.47 \pm 0.18%, 26.5 \pm 0.83% และ 3.08 \pm 0.06% ตามลำดับ ดังนั้นวิธีการนี้จึงน่าจะมีประโยชน์สำหรับใช้ในแผนการป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้เป็นอย่างดี

คำรหัส : DEAE Sephadex, ธาลัสซีเมีย, สตรีมีครรภ์

* ภาควิชากุมารเวชศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : A Modified Microcolumn Chromatography for Hb A₂ Determination

Chamrasratanakorn T*, Sanguansermisri T*, Punyakeaw A*

DEAE Sephadex A50 microcolumn chromatography is a standard technique to determine the level of Hb A₂. Here, we simplified this technique for thalassemia trait screening program in pregnancy women. Studying in each 30 cases of beta-thalassemia trait, Hb E trait and in normal Hb individuals showed the mean \pm S.D of $5.3 \pm 0.18\%$, $25.7 \pm 1.3\%$ and $2.9 \pm 0.06\%$ which correlated well with the values from standard technique of $5.47 \pm 0.18\%$, $26.5 \pm 0.83\%$ and $3.08 \pm 0.06\%$ respectively. This modified technique should be useful for using in severe thalassemia protection plan.

Key words : DEAE Sephadex, thalassemia, pregnancy

* Pediatric Department, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

บทนำ

ไฮโมไซกัสเบต้าธาลัสซีเมีย เป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรม ที่มีความรุนแรงรองจาก Hb Bart's hydrop fetalis¹ เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นภาระหนัก และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจสังคมและประเทศชาติ จึงต้องมีแผนการควบคุมป้องกันโรคนี้ ในแผนพัฒนาแห่งชาติฉบับที่ 8

การตรวจกรองพาหะเบต้าธาลัสซีเมียในสตรีตั้งครรภ์ เป็นจุดเริ่มต้นของการป้องกันที่ดีที่สุด แต่ถ้าใช้เพียงการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงโดยวิธี 2 minutes osmotic fragility test (2 MIN OF) และ Hb E Screening เป็นการตรวจกรอง ก็จะไม่สามารถบ่งชี้พาหะชนิดนี้ได้ อย่างชัดเจน ต้องอาศัยการตรวจวัดระดับ Hb A₂ ร่วม

ด้วย ซึ่งในกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจะมีค่าสูงกว่าคนปกติคือ = 4.0-9.0% ในขณะที่คนปกติมีค่าเพียง 2.5-3.5%²

เนื่องจากวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวัดค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานานในหลายขั้นตอน ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี และคณะ³ ได้ดัดแปลงและพัฒนาวิธีมาตรฐาน DEAE Sephadex A50 microcolumn chromatography สำหรับการตรวจวัดระดับ Hb A₂ มาใช้ในการตรวจกรอง Hb E อย่างได้ผล มีความไวและจำเพาะต่อ Hb E ได้ดี เรียกว่า วิธี Hb E Trait Screening

การศึกษานี้ได้ประยุกต์รวมทั้งสองวิธีการ มาพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับ Hb A₂ ให้มีความง่าย สะดวก ฉับไว เหมาะกับการใช้เป็นวิธีตรวจ

กรองร่วมกับวิธี 2 MIN OF และ Hb E Trait Screening เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการควบคุม ป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงต่อไป

วิธีการ

เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร พาหะ เบต้าธาลัสซีเมีย พาหะ Hb E และคนปกติกลุ่มละ

30 ราย โดยมี EDTA เป็นสารกันการแข็งตัวของเลือด ทำการตรวจวัดค่า % Hb A₂ โดยวิธีไมโคร-คอลัมน์โครมาโตกราฟีตามวิธีมาตรฐาน⁴ และวิธีประยุกต์ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในหลายขั้นตอนให้ ง่ายขึ้น และใช้เวลาน้อยลง เช่น การเตรียมคอลัมน์ และการเตรียมน้ำละลายเลือด ตามรายละเอียดใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงขั้นตอนการตรวจวัดระดับ Hb A₂ โดยวิธีไมโครคอลัมน์โครมาโตกราฟีประยุกต์ และวิธีมาตรฐาน

วิธีมาตรฐาน	วิธีประยุกต์
1. แซ้ DEAE Sephadex A50 ในบัฟเฟอร์ 1 ข้ามคืน	1. แซ้ DEAE Sephadex A50 ในบัฟเฟอร์ 1 ข้ามคืน
2. อัดแน่นลงใน Pasture pipette จนได้ความสูง 8-9 ซม.	2. เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 1 ใหม่ก่อนการอัดแน่นลงใน Pasture pipette จนได้ความสูง 8-9 ซม.
3. ผ่านบัฟเฟอร์ 1 รोजनแห่ง	
4. เตรียมน้ำละลายเลือดโดย 4.1 ล้างเลือดด้วย 0.9% NSS 3 ครั้ง 4.2 เม็ดเลือดแดงอัดแน่น + น้ำกลั่น 1:1 4.3 เติม CCl ₄ 1:1 เขย่าอย่างแรง และปั่น 3,000 rpm 15 นาที 4.4 ดูดน้ำละลายเลือดส่วนบนมาใช้	3. เตรียมน้ำละลายเลือดโดยละลายเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 30 μ L ในบัฟเฟอร์ 1 2 มล.
5. นำน้ำละลายเลือด 200 μ L ผสมกับบัฟเฟอร์ 1 ให้ได้ปริมาตร 20 มล.	
6. แบ่งน้ำละลายเลือด 10 มล. หยอดลงในคอลัมน์ รोजนแห่ง	4. แบ่งน้ำละลายเลือด 1 มล. หยอดลงในคอลัมน์ รोजนแห่ง
7. ปิดทับด้วย DEAE Sephadex A50 สูง 0.5 ซม. และผ่านซ้ำด้วยบัฟเฟอร์ 1 10 มล.	5. ปิดทับด้วย DEAE Sephadex A50 สูง 0.5 ซม.
8. ผ่านบัฟเฟอร์ 2 30 มล. และดวงเก็บบัฟเฟอร์ทั้งหมด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 415 nm เป็นค่า A1	6. ผ่านบัฟเฟอร์ 2 30 มล. และดวงเก็บบัฟเฟอร์ทั้งหมด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 415 nm เป็นค่า A1
9. นำน้ำละลายเลือดอีก 10 มล. จากข้อ 5 รวมกับน้ำกลั่น 20 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 415 nm เป็นค่า A2	7. นำน้ำละลายเลือดอีก 1 มล. จากข้อ 3 รวมกับน้ำกลั่น 29 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 415 nm เป็นค่า A2

หมายเหตุ บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.05M Tris-HCl-KCN ; บัฟเฟอร์ 1 มี pH = 8.2, บัฟเฟอร์ 2 มี pH = 8.5

คำนวณค่า % Hb A₂ จากสูตร

$$\% \text{Hb A}_2 = \frac{(A1 \times 100)}{A2}$$

ผลการศึกษา

ค่า % Hb A₂ ของแต่ละกลุ่มอาสาสมัครที่ได้จากวิธีประยุกต์มีดังนี้ กลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย มีค่าระหว่าง 4.2-9.2% คิดเป็นค่า mean \pm S.D = 5.3 \pm 0.18% พาหะ Hb E มีค่าระหว่าง 25.0-29.5% คิดเป็นค่า mean \pm S.D = 25.7 \pm 1.3% และคนปกติมีค่าระหว่าง 2.7-3.5% คิดเป็นค่า mean \pm S.D = 2.9 \pm 0.06%

ค่า % Hb A₂ ของแต่ละกลุ่มอาสาสมัครที่ได้จากวิธีมาตรฐานมีดังนี้ กลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย มีค่าระหว่าง 4.0-9.0% คิดเป็นค่า mean \pm S.D = 5.47 \pm 0.18% พาหะ Hb E มีค่าอยู่ระหว่าง 25.0-30.0% คิดเป็นค่า mean \pm S.D = 26.5 \pm 0.83% และคนปกติมีค่าระหว่าง 2.5-3.5% คิดเป็นค่า mean \pm S.D = 3.08 \pm 0.06%

จากผลการศึกษาค่า % Hb A₂ พบว่าค่าที่ได้จากการตรวจหาด้วยวิธีไมโครคอลัมน์โครมาโตกราฟีประยุกต์ไม่แตกต่างไปจากค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน เปรียบเทียบเป็นค่า mean \pm S.D ได้ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่า mean \pm S.D ของ % Hb A₂ ที่ได้จากวิธีไมโครคอลัมน์โครมาโตกราฟีประยุกต์และวิธีมาตรฐาน

ภาวะตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ราย)	วิธีมาตรฐาน (%)	วิธีประยุกต์ (%)
พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	30	5.47 \pm 0.18	5.3 \pm 0.18
พาหะ Hb E	30	26.5 \pm 0.83	25.7 \pm 1.3
คนปกติ	30	3.08 \pm 0.06	2.9 \pm 0.06

วิจารณ์

จากการเปรียบเทียบขั้นตอนการปฏิบัติงานของวิธีไมโครคอลัมน์โครมาโตกราฟีประยุกต์กับวิธีมาตรฐานเดิม จะเห็นว่าวิธีประยุกต์สามารถประหยัดเวลาได้มากในขั้นตอนการเตรียมน้ำละลายเลือด และการหยอดน้ำละลายเลือดผ่านคอลัมน์ ทั้งยังประหยัดสารโดยการตัดขั้นตอนการใช้สาร

ละลายคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl₄) ทำให้ได้วิธีที่ประหยัด สะดวก รวดเร็ว และได้ค่า % Hb A₂ ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานเดิม (p > 0.05) ดังนั้น วิธีไมโครคอลัมน์โครมาโตกราฟีประยุกต์นี้ จึงน่าจะใช้ตรวจกรองพาหะเบต้าธาลัสซีเมียแทนวิธีมาตรฐานเดิมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. ประเวศ วะสี. ธาลัสซีเมีย. Thai Med Tech Letter 2540; 8: 2-8.
2. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี. วิธีการตรวจรักษาและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงในเด็ก. พิมพ์ครั้งที่ 1, เชียงใหม่ : ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2539: 161-5.
3. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, อารีรัตน์ ปัญญาเขียว, กวี ไชยศิริ. Hb E Trait Screening. การประชุมสัมมนาวิชาการเรื่องการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ครั้งที่ 4 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 21-22 พ.ย. 2539.
4. Huisman THJ, Jonxis JHP. The Hemoglobinopathies, Techniques of Identification. Clinical and Biochemical Analysis. Vol 6, 1977, New York, Marcel Dekker.