

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค HbE β^0 -Thalassemia โดยการวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินจากเลือดของฟีตัส ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography”

ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ, ภัทรา ธนรัตน์กร, ชเนนทร์ วนาภิรักษ์*,
สุพัตรา ศิริโชติยะกุล*, ธีระ ทองสง*, พงษ์ จันทร์ประภาพ*, พรธนี ศิริวรรณภา*,
รัตนติกา แซ่ตั้ง และ ศศินียา จำรัสรัตนกร

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์; *ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์และความเป็นมา: HbE β^0 -thalassemia เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงอีกชนิดหนึ่ง นอกจาก β -thalassemia major และ Hb Bart's hydrops fetalis การวินิจฉัยก่อนคลอดมีความจำเป็นเพื่อหญิงที่ตั้งครรภ์ที่เสี่ยงจะมีลูกเป็นโรคดังกล่าวมีทางเลือกในการขอรับบริการทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสม ซึ่ง β -thalassemia gene ในเขตภาคเหนือส่วนใหญ่เป็นชนิด β^0 -thalassemia gene ทำให้ไม่สามารถสร้าง HbA ดังนั้นการวัดสัดส่วนของ HbA จากเลือดของฟีตัสโดยตรง น่าจะเป็นวิธีการวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค HbE β^0 -thalassemia ได้ **วิธีการศึกษา:** ตัวอย่างเลือดฟีตัสที่ทำการศึกษา อายุระหว่าง 18-22 สัปดาห์ ได้มาจากการทำ cordocentesis ของหญิงที่เสี่ยงจะให้บุตรเป็นโรค HbE β -thalassemia จำนวน 623 ราย โดยนำไปวิเคราะห์สัดส่วนต่างๆ ของชนิดของฮีโมโกลบิน ด้วยวิธี automated HPLC และบางรายได้ตรวจยืนยันชนิดของ β^0 -thalassemia mutation ด้วยวิธี automated fluorescence DNA sequencing technique **ผลการศึกษา:** จากการวิเคราะห์เลือดตัวอย่างของฟีตัส 623 ราย ด้วยวิธี automated HPLC พบ chromatogram 3 ชนิดด้วยกันคือ FE FAE และ FA chromatogram ชนิด FE พบ 152 ราย โดยเป็น HbE β^0 -thalassemia 151 ราย ซึ่งมีค่าสัดส่วนของ HbE เท่ากับ $1.3 \pm 0.3\%$ และอีก 1 ราย เป็น homozygous HbE มีค่าสัดส่วนของ HbE เท่ากับ 2.6% chromatogram ชนิด FAE พบ 189 ราย โดยเป็น HbE trait 186 ราย ซึ่งมีค่าสัดส่วนของ HbA เท่ากับ $2.1 \pm 1.0\%$ และ HbE เท่ากับ $1.2 \pm 0.3\%$ ทุกรายมีค่าสัดส่วนของ HbA มากกว่า HbE แต่มี 3 ราย ที่มีค่าสัดส่วนของ HbA น้อยกว่า HbE เป็น HbE β^0 -thalassemia และผลการตรวจ DNA analysis พบเป็น compound heterozygote ระหว่าง -28 (A-G) กับ codon26 (G-A) chromatogram ชนิดที่ 3 คือ chromatogram ที่มี Hb FA ซึ่งเป็น β -thalassemia trait หรือ normal fetuses สัดส่วนของ HbA มีค่าตั้งแต่ 0.8-9.2% มีจำนวน 282 ราย แต่ไม่สามารถแยกภาวะทั้งสองออกจากกันได้ชัดเจนด้วยสัดส่วนของ HbA การศึกษา β -thalassemia mutation ในแต่ละกลุ่มยืนยันผลการวินิจฉัยชนิดของธาลัสซีเมียด้วยวิธี automated HPLC **วิจารณ์และสรุป:** การวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบิน จากเลือดของฟีตัสโดยตรงด้วยวิธี automated HPLC ให้ภาพ chromatogram ของ HbE β^0 -thalassemia ต่างจากฟีตัสที่เป็น HbE trait, β -thalassemia trait และฟีตัสปกติอย่างชัดเจน คือฟีตัสที่เป็น HbE β^0 -thalassemia จะมีภาพ chromatogram เป็น FE ไม่มี HbA และมีค่าสัดส่วนของ HbE อยู่ระหว่าง 0.7-1.9% วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการไม่ยุ่งยาก ให้นผลเร็ว สั้นปลี่ยนค่าใช้จ่ายต่อรายน้อย สามารถใช้เป็นวิธีการการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค HbE β^0 -thalassemia ได้

Key Words : ● Prenatal diagnosis ● HbE β^0 -thalassemia ● High performance liquid chromatography

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2546;13:305-14.

ได้รับต้นฉบับ 30 มิถุนายน 2546 ให้ลงตีพิมพ์ 8 กันยายน 2546 ต้องการสำเนาต้นฉบับกรุณาติดต่อ ศ.นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต ปีที่ 13 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม 2546

การวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อกำหนดชนิดของโรคธาลัสซีเมียของฟีตัสในครรภ์ของหญิงเสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพราะเด็กที่เกิดมาเป็นโรคธาลัสซีเมียเกือบทั้งหมดรักษาไม่หาย และต้องเสียค่ารักษาแบบประคับประคองเป็นจำนวนเงินที่สูงมาก เพื่อให้มีชีวิตอยู่ซึ่งมีผลกระทบด้านสังคมและเศรษฐกิจต่อครอบครัวเป็นอย่างมาก ดังนั้นการวินิจฉัยก่อนคลอดจึงมีประโยชน์ เพราะจะสามารถทำให้หญิงตั้งครรภ์ที่ทารกในครรภ์เป็นโรคธาลัสซีเมียมีทางเลือกในการขอรับบริการทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสม

วิธีวินิจฉัยก่อนคลอดทางห้องปฏิบัติการที่เป็นสากลใช้การตรวจด้วยวิธี DNA technique ซึ่งจะต้องตรวจเพื่อกำหนดชนิดของ globin gene mutation ในคู่เสี่ยงก่อน เมื่อทราบความผิดปกติที่แน่นอนแล้ว จึงตรวจหาความผิดปกติในเนื้อเยื่อของฟีตัส ได้แก่ชิ้นรก หรือ cells จาก amniotic fluid^{1,2} นอกจากนั้น ในการกำหนดชนิดของโรคธาลัสซีเมียของฟีตัสยังต้องใช้ DNA technique ตรวจการปนเปื้อนเนื้อเยื่อของมารดาในเนื้อเยื่อของฟีตัสทุกครั้ง เพื่อป้องกันการแปลผลผิดพลาด ทำให้การตรวจด้วยวิธี DNA technique เพื่อการวินิจฉัยก่อนคลอดมีขั้นตอนมาก ต้องลงทุนสูงและห้องปฏิบัติการด้าน DNA technique ในประเทศไทยยังมีจำนวนจำกัด ซึ่งไม่สามารถให้บริการได้อย่างกว้างขวาง

การตรวจชนิดของฮีโมโกลบินของฟีตัสด้วยวิธี automated high performance liquid chromatography นอกจากใช้ในการวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อกำหนดฟีตัสเป็นโรค Hb Bart's hydrops fetalis และ โรค β -thalassemia major^{3,4} ในการรายงานครั้งนี้ผู้รายงานและคณะขอแสดงให้เห็นว่าการตรวจวิธีนี้สามารถใช้เพื่อกำหนดฟีตัสที่เป็นโรค HbE β^0 -thalassemia ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงได้อีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นหญิงตั้งครรภ์ที่มีโอกาส

เสี่ยงที่จะให้บุตรเป็นโรค HbE β -thalassemia 623 ราย 621 ราย มาจากคู่เสี่ยงที่บิดาหรือมารดาคนใดคนหนึ่งเป็น β -thalassemia trait ส่วนอีกคนหนึ่งเป็น heterozygous HbE หรือ HbE trait (ตารางที่ 1) ส่วนอีก 2 ราย เป็นคู่เสี่ยงที่มารดาเป็น HbE β -thalassemia และบิดาเป็น homozygous HbE กับ HbE trait อย่างละ 1 ราย (คู่เสี่ยงพิเศษ) ในจำนวนนี้ 104 ราย เคยมีบุตรเป็นโรค HbE β -thalassemia มาแล้วทุกราย มีอายุครรภ์อยู่ระหว่าง 18-22 สัปดาห์ ผ่านขบวนการ thalassemia counseling และได้รับการตรวจคัดกรองด้วยวิธี osmotic fragility test, HbE screening test และตรวจยืนยันยืนยันความเป็นคู่เสี่ยงด้วยวิธี A2 test^{5,7} พร้อมสามีมาเรียบร้อยแล้ว และสมัครใจขอรับการวินิจฉัยก่อนคลอดโดยการยินยอมให้ตรวจเลือดฟีตัสจากสายสะดือ (cordocentesis)^{8,9}

การตรวจการปนเปื้อนเลือดมารดา

นำเลือดฟีตัสมาทำเป็น blood smear บางๆ ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำ blood smear ไป fixed แบบจุ่มลงใน 80% ethyl alcohol 3 นาที และย้อมแบบเดียวกันในน้ำยา 0.1% amido-black 10 B ใน 80% ethyl alcohol ที่มี pH 2.0 อีก 3 นาที จากนั้นนำไปล้างสีออกด้วยน้ำประปาไหลรินอีก 1 นาที เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 400 เท่า เม็ดเลือดแดงของฟีตัสติดสีน้ำเงินเข้ม (F-cell) ส่วนเม็ดเลือดของมารดาจะเห็นเป็นซากเซลล์ (A-cell) ถ้าพบ A-cell มาก 1 ต่อ 500 ตัวของ F-cell แสดงว่าเลือดตัวอย่างนั้นปนเปื้อนเลือดมารดา¹⁰

การตรวจชนิดของฮีโมโกลบินจากเลือดของฟีตัส

นำเลือดตัวอย่างจำนวน 5 ไมโครลิตรละลายใน lysis buffer 1 ซีซี และฉีดเข้าเครื่อง Automated HPLC (Variant TM Hemoglobin Testing System ; Bio-Rad Laboratories) โดยใช้ β -thalassemia Short Program เครื่องจะวิเคราะห์ชนิดของ Hemoglobin และคำนวณสัดส่วนของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดเป็นเปอร์เซ็นต์¹¹

ตารางที่ 1 แสดงค่า Osmotic fragility test (OF), HbA₂ ในคู่สามีภรรยาที่เสี่ยงจะมีลูกเป็นโรค HbE β -thalassemia และสัดส่วนของ HbE ในฟีตัสที่เป็นโรค HbE β -thalassemia ที่มี chromatogram เป็น HbF กับ HbE

Couples	บิดา/มารดา	OF (%)	A2, E (%)	Fetus (ages) (wk)	E% in fetus
1.	มารดา	46.2	23.4	18	1.1
	บิดา	42.8	6.4		
2.	มารดา	34.3	21.5	20	1.1
	บิดา	29.8	5.7		
3.	มารดา	59.4	25.0	18	1.2
	บิดา	24.4	6.2		
4.	มารดา	28.9	5.3	20	1.4
	บิดา	48.7	19.0		
5.	มารดา	24.1	5.4	20	1.2
	บิดา	69.7	24.6		
6.	มารดา	25.3	6.1	21	1.6
	บิดา	35.4	23.2		
7.	มารดา	18.8	21.0	20	1.3
	บิดา	25.8	5.5		
8.	มารดา	30.7	5.1	19	1.7
	บิดา	75.0	24.3		
9.	มารดา	43.2	6.8	22	1.8
	บิดา	39.4	28.1		
10.	มารดา	16.2	7.6	19	1.3
	บิดา	28.3	25.4		
11.	มารดา	42.2	80.0	20	1.3
	บิดา	21.9	7.9		
12.	มารดา	33.5	6.8	18	1.4
	บิดา	61.0	24.0		
13.	มารดา	33.3	5.5	18	1.3
	บิดา	58.3	20.6		

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของ chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์เลือดของฟีตัสที่เสี่ยงจะเป็นโรค HbE β -thalassemia ด้วยวิธี automated HPLC

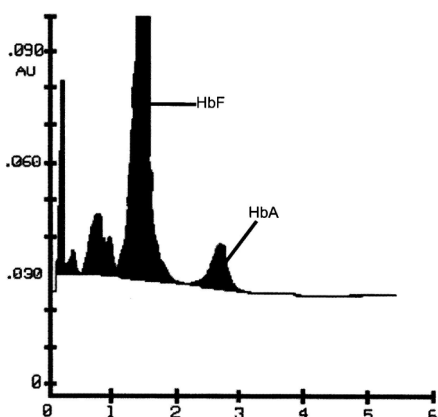
Hb typing	Type of thalassemia	Cases	%
F A	Normal + β -thal trait	282	45.26
F A E- F A > E	Hb E trait	186	29.86
F A < E	Hb E β -thal	3	0.48
F E	Hb E β -thal	151	24.24
	Homo. HbE*	1	0.16
Total cases		623	100.00

*Homozygous HbE

การวิเคราะห์ชนิดของ β -thalassemia mutation

ใช้วิธี Automated Fluorescence DNA Sequencing technique วิธีการประกอบด้วยการนำเลือดฟัสดมาสกัดแยกเอา DNA ด้วยวิธี chelex extraction DNA ที่ได้นำไปเพิ่มปริมาณ beta globin gene บริเวณ Exon I, II และ Exon III ด้วยวิธี PCR technique beta-globin gene บริเวณ Exon I, II และ Exon III ที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านลง OIA quick spin column (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) จากนั้นนำไปหา beta thalassemia mutation โดยทำ Asymetric PCR กับชุดน้ำยาของบริษัท ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction ตามขั้นตอนที่กำหนดไว้ และอ่านลำดับ DNA ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer (Perkin-Elmer Corporation)¹²

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
Unknown 1	7.4	0.72	227738
	2.8	0.91	72018
F	83.5	1.37	2574439
Ao	6.0	2.65	208718
TOTAL AREA			3093973
F	0.0%	A2	0.0%



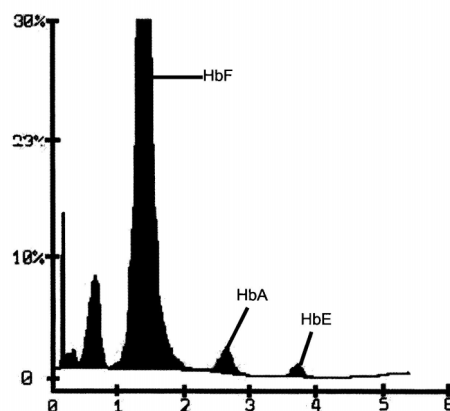
รูปที่ 1 แสดง HPLC-chromatogram จากเลือดฟัสด อายุ 18 สัปดาห์ ประกอบด้วย HbF (83.5%) กับ HbA (6%) เป็นฟัสดปกติ

ผลการศึกษา

หญิงมีครรภ์ที่มีโอกาสเสี่ยงที่จะให้บุตรเป็นโรค HbE β^0 -thalassemia และได้รับการวินิจฉัยก่อนคลอดโดยการตรวจเลือดจากสายสะดือของฟัสด เมื่ออายุครรภ์ระหว่าง 18-22 สัปดาห์ จำนวน 623 ราย พบการปนเปื้อนเลือดมารดา 11 ราย และทั้ง 11 รายได้รับการตรวจ cordocentesis ซ้ำอีกคนละหนึ่งครั้ง

การวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินจากเลือดตัวอย่างของฟัสดทั้งสิ้น 623 ราย พบ chromatogram ได้ 3 แบบ แบบแรกมีเฉพาะ HbF กับ HbA (รูปที่ 1) มีจำนวน 282 ราย (45.3%) ค่าสัดส่วนของ HbA มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8-9.2% chromatogram แบบที่ 2 ประกอบด้วย HbF HbA และ HbE มี 189 ราย (30.4%) HbF มีสัดส่วนมากที่สุดรองลงมาเป็น HbA และ HbE (รูปที่ 2) chromatogram แบบนี้มีจำนวน 186 ราย โดยมี

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	96.2	1.34	3102297
Ao	2.5	2.62	81255
E	1.3	6.69	36254
TOTAL AREA			3219886
F	0.0%	E	1.3%



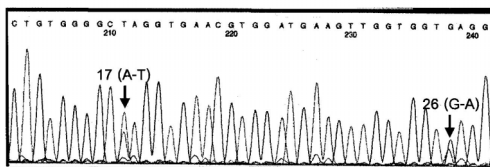
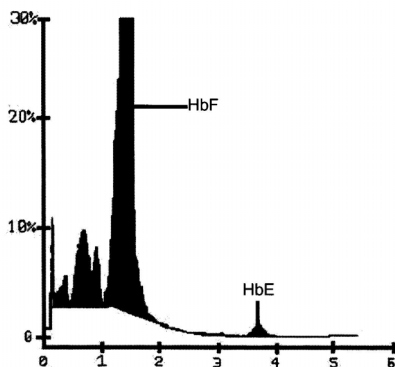
รูปที่ 2 แสดง HPLC-chromatogram จากเลือดฟัสด อายุ 20 สัปดาห์ เป็นชนิด HbF (96.2%) ,HbA (2.5%) HbE(1.3%) และการตรวจยืนยัน DNA mutation เป็น heterozygous codon 26 (G-A) เข้าได้กับฟัสดที่เป็น HbE trait

สัดส่วนของ HbA มีค่าอยู่ระหว่าง 1.2-7.9% (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $2.1 \pm 1.0\%$) และสัดส่วนของ HbE มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-1.9% (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1.2 \pm 0.3\%$) และทุกรายมีค่าสัดส่วนของ HbA มากกว่า HbE แต่มีเพียง 3 ราย ที่มีสัดส่วนของ HbA น้อยกว่า HbE โดยรายแรก HbA มีค่า 0.3% ขณะที่ HbE มีค่า 0.9% รายที่ 2 HbA มีค่า 0.6% HbE มีค่า 1.5% และรายที่ 3 HbA มีค่า 0.8% HbE มีค่า 1.6% chromatogram แบบที่ 3 ประกอบด้วย HbF และ HbE (รูปที่ 3) มีจำนวน 152 ราย โดยมีสัดส่วนของ HbE อยู่ระหว่าง 0.3-1.9% (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1.3 \pm 0.3\%$) 151 ราย (24.3%) แต่มีเพียง 1 รายที่มีค่า HbE อยู่ที่ 2.6%

ANALYTE	ID	%	TIME	AREA
Unknown	1	1.5	6.69	65995
F		97.1	1.32	4148788
AO		0.1	2.19	3484
E		1.3	3.69	48321

TOTAL AREA 4266568

F 98.0% E 1.3%



รูปที่ 3 แสดง HPLC-chromatogram ของฟิสิกส์อายุ 19 สัปดาห์ ชนิด HbF กับ HbE และผล DNA analysis เป็น compound heterozygous codon 17 (A-T) / codon 26 (G-A) เข้าได้กับฟิสิกส์ที่เป็นโรค HbE β -thalassemia

ผลการตรวจ β -thalassemia mutation ด้วยวิธี fluorescence DNA sequencing ของฟิสิกส์ที่ Hb typing เป็น chromatogram แบบแรกที่มีเฉพาะ HbF กับ HbA จำนวน 34 ราย สุ่มมาจากกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ตามปริมาณสัดส่วนของ HbA คือฟิสิกส์ที่มีค่า HbA อยู่ระหว่าง 0.8-2.5% สุ่มมา 16 ราย 2.51-5% สุ่มมา 11 ราย และมากกว่า 5% สุ่มมา 7 ราย

ผลการตรวจ β -thalassemia mutation ของกลุ่มแรกค่า HbA อยู่ระหว่าง 0.8-2.5% 16 ราย พบ codon 41/42 (-TCTT) 8 ราย IVS-I (G-T) 3 ราย codon 17 (A-T) 2 ราย codon 35 (C-A) 2 ราย และ -28 (A-G) 1 ราย กลุ่มที่ 2 ค่า HbA อยู่ระหว่าง 2.1-5% นำมาตรวจ β -thalassemia mutation 11 ราย พบ codon 41/42 (-TCTT) 2 ราย codon 17 (A-T) 2 ราย และ IVS-I (G-T) 1 ราย อีก 6 ราย ไม่พบ β -thalassemia mutation และกลุ่มที่ 3 ที่มีค่า HbA มากกว่า 5% นำมาตรวจ β -thalassemia mutation 7 ราย พบ 1 ราย เป็น β -thalassemia mutation ชนิด codon 17 (A-T) สัดส่วนของ HbA ของฟิสิกส์ที่ chromatogram เป็น HbF - A และตรวจพบ β -thalassemia mutation จำนวน 22 ราย มีค่าเฉลี่ย HbA เท่ากับ $2.2 \pm 0.9\%$ และของฟิสิกส์ 12 ราย ที่ตรวจไม่พบ β -thalassemia mutation มีค่า HbA เฉลี่ยเท่ากับ $5.0 \pm 2.5\%$ และเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่า ฟิสิกส์กลุ่มที่ตรวจไม่พบ β -thalassemia mutation มีค่าสัดส่วนของ HbA สูงกว่ากลุ่มที่ตรวจพบ β -thalassemia mutation อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$)

ผลการตรวจ β -thalassemia mutation ของฟิสิกส์ที่มี chromatogram เป็นแบบที่ 2 ซึ่ง ประกอบด้วย HbF HbA และ HbE โดยสุ่มมาตรวจ 15 ราย ทุกรายมีค่าสัดส่วนของ HbA มากกว่า HbE พบเป็น heterozygote ของ codon 26 (G-A) เข้าได้กับ HbE trait ส่วนอีก 3 รายที่มีค่าสัดส่วนของ HbA น้อยกว่า HbE ผลการตรวจ β -thalassemia mutation พบเป็น com-

pound heterozygote ระหว่าง -28 (A-G) กับ codon 26 (G-A) (รูปที่ 4)

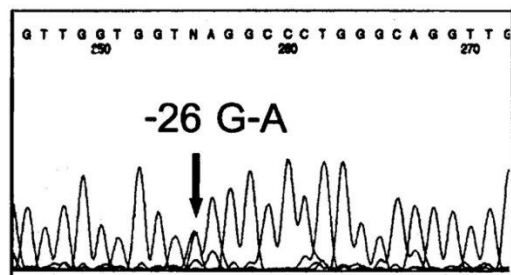
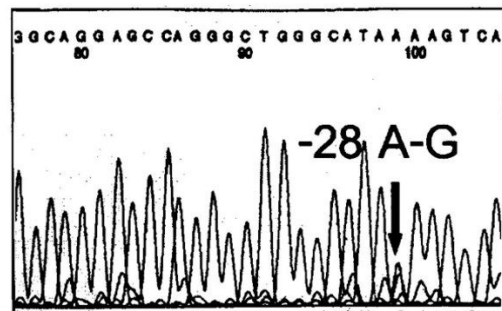
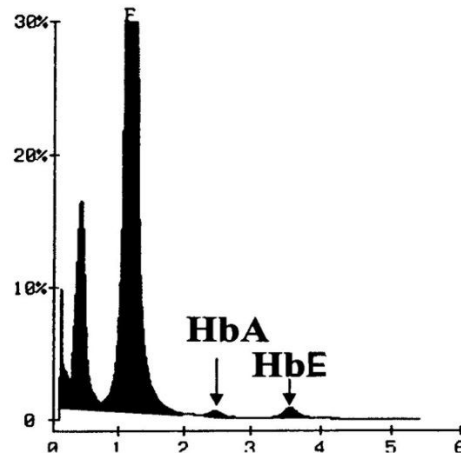
ผลการตรวจ β -thalassemia mutation ของพีดีเอส เป็นแบบที่ 3 ที่มี chromatogram ซึ่งมีเฉพาะ HbF กับ HbE โดยตรวจพีดีเอสที่มีค่า HbE น้อย 1% จำนวน 7 ราย พบเป็น compound heterozygote ระหว่าง codon 26 (G-A) กับ codon 41/42 (-TCTT) 4 ราย กับ codon 17 (A-T) 2 ราย และกับ IVS I-I (G-T) 1 ราย และสุ่มตรวจจากพีดีเอสที่มีค่า HbE ระหว่าง 1-1.9% 18 ราย พบเป็น compound heterozygote ระหว่าง codon 26 (G-A) กับ codon 41/42 (-TCTT) 11 ราย กับ codon 17 (A-T) 6 ราย และกับ codon 43 (G-T) 1 ราย ในกลุ่มนี้มีพีดีเอส 1 รายที่มีค่า HbE เท่ากับ 2.6% ผลการตรวจ beta globin gene mutation พบเป็น homozygous codon 26 (G-A) และเป็นรายที่มาจาก มารดาเป็น HbE β -thalassemia กับบิดาเป็น homozygous HbE

วิจารณ์

การวินิจฉัยก่อนคลอดโดยการวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินของพีดีเอสอายุระหว่าง 18-22 สัปดาห์ ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรค HbE β -thalassemia ด้วยวิธี automated HPLC จำนวน 623 ราย พบ chromatogram ของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ได้ 3 แบบ ภาพ chromatogram มีเฉพาะ HbF กับ HbE ไม่พบ HbA สามารถให้การวินิจฉัย โรค HbE β -thalassemia ซึ่งมี 151 ราย HbE มีค่าตั้งแต่ 0.3-1.9% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1.3 \pm 0.3\%$ ผลการสุ่มตรวจ β -thalassemia mutation 25 ราย (10%) พบเป็น compound heterozygote ระหว่าง β -thalassemia gene กับ codon 26 (G-A) เข้าได้กับโรค HbE β -thalassemia ทุกสาย และ β -thalassemia mutation ที่พบบ่อยคือ codon 41/42 (-TCTT) กับ codon 17 (A-T) ซึ่งตรงกับที่เคยมีรายงานไว้แล้ว¹⁶

SAMPLE ID# 000000000000000004,4

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	106.8	1.16	5089009
AO	0.3	2.46	15306
E	0.9	3.56	39434
TOTAL AREA			5063749
F	106.8%	E	0.9%



รูปที่ 4 แสดง chromatogram ชนิด FAE HbA มีค่า 0.3% HbE เท่ากับ 0.9% ผล DNA sequencing เป็น compound heterozygous -28 (A-G) / Codon 26 (G-A) เข้าได้กับพีดีเอสที่เป็นโรค HbE β -thalassemia

Chromatogram ของพีคัส 1 ราย ที่เกิดจากคู่เสี่ยง พิเศษ คือ คู่เสี่ยงที่อาจให้บุตรเป็นโรค HbE β -thalassemia หรือ homozygous HbE chromatogram มีเฉพาะ HbF กับ HbE แต่ระดับ HbE มีค่า 2.6% ซึ่งเป็นระดับที่สูงกว่าที่พบในพีคัสที่เป็น HbE β -thalassemia ($HbE = 1.3 \pm 0.3\%$ $N=151$) และรายนี้ได้รับการพิสูจน์ด้วยวิธี DNA technique พบว่าเป็น homozygous HbE โดยที่ข้อมูลเกี่ยวกับพีคัสที่เป็น homozygous HbE ยังมีไม่มาก ดังนั้นในรายที่พีคัสเกิดจากคู่เสี่ยงพิเศษ นอกจากดูจากสัดส่วนของ HbE แล้วยังต้องตรวจด้วยวิธี DNA technique เพื่อกำหนดว่าพีคัสเป็น homozygous HbE หรือไม่

Chromatogram แบบที่ 2 ที่ประกอบด้วย HbF HbA และ HbE มีจำนวน 189 ราย 186 ราย เป็น HbE trait ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญคือค่าสัดส่วนของ HbA มีค่ามากกว่า HbE ($A = 2.1 \pm 1$, $E = 1.2 \pm 0.3\%$) ค่า HbA แม้มาจาก β globin gene เพียงโลกลัสเดียวแต่มีการ

กระจายมากคือ 1.2-7.9% ขณะที่ค่าสัดส่วนของ HbE ซึ่งมาจาก beta E globin gene โลกลัสเดียวเช่นกัน แต่สร้างได้น้อยกว่า β globin gene ปกติจึงมีค่าอยู่ที่ 0.5-1.9% ใกล้เคียงกับสัดส่วนของ HbE ในพีคัสที่เป็น HbE β -thalassemia (รูปที่ 5)

พีคัส 3 ราย ที่มี chromatogram เป็น HbF HbA และ HbE แต่มีสัดส่วนของ HbA น้อยกว่า HbE ซึ่งแสดงถึงความผิดปกติในการทำงานของ beta-globin gene ที่สร้างได้น้อยลง และเข้าได้กับพวก β^+ -thalassemia และทั้งสามรายเป็น HbE β^+ -thalassemia และยีนของ β^+ -thalassemia คือ -28 (A-G)

Chromatogram แบบที่สามเป็น chromatogram ที่ประกอบด้วย HbF กับ HbA กลุ่มนี้มีสัดส่วนของ HbA ตั้งแต่ 0.8-9.2% เป็น chromatogram ของพีคัสเมื่อเกิดมาจะเป็น β -thalassemia trait หรือพีคัสที่ไม่มี beta thalassemia mutation (พีคัสปกติ) จากการศึกษา β -thalassemia mutation ในพีคัสที่มีค่าสัดส่วน

	Homo E	HbE β^0 -thal	HbE trait	β thal trait	Normal
	N = 15	N = 151	N = 186	N = 22*	N = 12*
5					<u>5.0 ± 2.5</u>
4					
3					
2	<u>2.5 ± 0.5</u>		<u>2.1 ± 1.0</u>	<u>2.2 ± 0.9</u>	
1		<u>1.3 ± 0.3</u>	<u>1.2 ± 0.3</u>		
	HbE	HbE	HbE-A	HbA	HbA

รูปที่ 5 เป็นภาพแสดงค่าเฉลี่ยของ HbA และ HbE ของพีคัสอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ HPLC chromatogram ของพีคัสชนิด homozygous HbE, HbE β^0 -thalassemia, HbE trait, β -thalassemia trait และพีคัสปกติ (*mutation proved)

ของ HbA น้อยกว่า 2.5% พบเป็น β -thalassemia trait ทุกราย และถ้า HbA มีค่ามากกว่า 2.5% อาจเป็นได้ทั้ง β -thalassemia trait และฟีตัสปกติ แต่ที่แน่นอนคือ ฟีตัสที่มี chromatogram เป็น HbF และ HbA เมื่อเกิดมาจะไม่เป็นโรค HbE β^+ -thalassemia

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการวินิจฉัยก่อนคลอดด้วย วิธี HPLC กับ DNA technique แล้ว วิธี DNA technique สามารถตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียของทารกในครรภ์ได้ตั้งแต่ไตรมาสแรก ขณะที่วิธี HPLC ตรวจได้เฉพาะ ในไตรมาสที่ 2 ของการตั้งครรภ์ นอกจากนี้การได้ตัวอย่างเลือดโดยวิธี cordocentesis ทำได้ยากกว่าการทำ chorionic villi sampling ถึงแม้ว่าจะมี fetal loss rate ไม่ต่างกัน¹³ แต่ข้อดีของการวินิจฉัยก่อนคลอดโดยวิธี automated HPLC คือมีราคาถูก (1,000 บาท/ราย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) และให้ผลรวดเร็ว (ไม่เกิน 30 นาที) และใช้ได้อย่างเหมาะสมกับสภาพในปัจจุบันคือ หญิงตั้งครรภ์ส่วนใหญ่มาฝากครรภ์สาย ล่วงเข้าไปไตรมาสที่ 2 ข้อดีอีกข้อหนึ่ง คือ การแปลผลการวินิจฉัยก่อนคลอดไม่ยุ่งยากขึ้นเพราะ β -thalassemia mutation เกือบทั้งหมดเป็นชนิด β^+ gene จึงไม่มีการสร้าง HbA ทำให้ chromatogram ของฟีตัสที่เป็นโรค HbE β^+ -thalassemia ไม่มี HbA สามารถแยกจากฟีตัสที่เป็น HbE trait β -thalassemia trait และฟีตัสปกติได้ง่ายและชัดเจน

อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรพิจารณาคือความเสี่ยงพิเศษที่อาจให้บุตรเป็นโรค HbE β^+ -thalassemia หรือ homozygous HbE ที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีเพียง 2 คู่เท่านั้น จาก 623 คู่ และมีฟีตัส 1 ราย มี chromatogram เป็น HbF และ HbE แม้สัดส่วนของ HbE จะสูงเข้าได้กับฟีตัสที่เป็น homozygous HbE แต่จากการสำรวจ chromatogram ของฟีตัสที่เป็น homozygous HbE 15 ราย พบว่ามีค่าสัดส่วนของ HbE ตั้งแต่ 1.7-3.4% ($2.5 \pm 0.5\%$) ทำให้ไม่สามารถกำหนดชนิดของฟีตัสด้วย chromatogram ได้ ดังนั้นการตรวจยืนยันด้วยวิธี DNA

technique ยังมีความจำเป็นเพื่อให้ได้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง

ฟีตัสที่เป็น HbE β^+ -thalassemia 151 รายกับอีก 3 รายที่เป็น HbE β^+ -thalassemia หลังให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ที่ดีแล้วมีเพียง 5 รายที่ขอให้การตั้งครรภ์ดำเนินต่อไปในจำนวนนี้เป็น HbE β^+ -thalassemia 2 ราย มี 1 รายเป็นบุตรแฝดโดยอีกคนหนึ่งที่เป็นคู่แฝดเป็นฟีตัสปกติ ที่เหลืออีก 2 รายเป็นครอบครัวที่เคยมีบุตรเป็น HbE β -thalassemia มาแล้ว และให้เหตุผลว่าสามารถดูแลได้ ส่วนครอบครัวที่เหลือสมัครใจขอรับบริการหยุดการตั้งครรภ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวกำหนดที่ทำให้เกิด clinical heterogeneity ในโรค HbE β -thalassemia ควรจะได้ศึกษาอย่างจริงจังเพื่อใช้เป็นแนวทางในการให้บริการทางพันธุศาสตร์ที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป^{15,16}

ท้ายที่สุดขบวนการควบคุมและป้องกันการเกิดโรค HbE β -thalassemia โดยการตรวจคัดกรองด้วยวิธี OF HbE Screening และการวัดสัดส่วนของ HbA₂ เพื่อกำหนดคู่สมรสที่เสี่ยงจะเป็นโรค HbE β -thalassemia ร่วมกับการวิเคราะห์สัดส่วนของฮีโมโกลบินของฟีตัสด้วยวิธี automated HPLC มีความแม่นยำสูงเห็นได้จากจำนวนฟีตัส 623 ราย พบเป็น HbE β^+ -thalassemia 151 ราย หรือเท่ากับ 24.2% ซึ่งเป็นไปตาม mendelian law of inheritance ($p = 0.5$) และเป็นนวัตกรรมใหม่ต่างไปจากวิธีที่เคยมีรายงานไว้ในต่างประเทศอย่างสิ้นเชิง และมั่นใจว่าสามารถประยุกต์ใช้ในพื้นที่ทั่วประเทศไทยได้

สรุป

ได้ทำการศึกษาวิธีการห้องปฏิบัติการสำหรับการวินิจฉัยก่อนคลอดของหญิงตั้งครรภ์ อายุครรภ์ระหว่าง 18-22 สัปดาห์ ที่เสี่ยงจะให้บุตรเป็นโรค HbE β -thalassemia จำนวน 623 ราย โดยวิเคราะห์สัดส่วนของชนิดของฮีโมโกลบินโดยตรงจากเลือดตัวอย่างของฟีตัส ซึ่ง

ได้มาจากการทำ cordocentesis ด้วยวิธี automated HPLC พบ chromatogram 3 ชนิด คือ FE FAE และ FA chromatogram ชนิด FE เท่านั้น เป็น chromatogram ของ ฟิตัสที่เมื่อเกิดมาจะเป็น HbE β^0 -thalassemia และพบ 151 ราย (24.2%) สำหรับกรณีที่ฟิตัสนั้น อาจเป็นได้ทั้ง HbE β^0 -thalassemia หรือ homozygous HbE ต้องตรวจด้วยวิธี DNA technique ต่อ เพราะ chromatogram ของฟิตัสทั้งสองชนิดเหมือนกัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์สัดส่วนของ ฮีโมโกลบิน โดยตรงจากเลือดของฟิตัสอายุระหว่าง 18-22 สัปดาห์ สามารถใช้ในการวินิจฉัยก่อนคลอดของโรค HbE β^0 -thalassemia ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณรัตนวรรณ เศรษฐี คุณอภิรดี ตรรกไพจิตร หัวหน้าพยาบาลห้อง ANC แผนกสูติ ศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยให้ข้อมูลเกี่ยวกับหญิงฝากครรภ์ คุณกนกกรัตน์ ใจกล้า ที่ช่วยพิมพ์รายงานผลงานครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Winichagoon P, Saechan V, Sripanich R, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia by reverse dot-blot hybridization. *Prenat Diag* 1999;19:428-35.
- Cao A, Rosatelli, Monni G, Galanello R. Screening for thalassemia : a model of success. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002;29:305-28.
- Sanguansermsri T, Thanarattanakorn P, Steger HF, 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;32:1-6.
- Sanguansermsri T, Thanarattanakorn P, Steger HF, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia major by HPLC analysis of hemoglobins in fetal blood samples. *Hemoglobin* 2001;25:19-27.
- Sanguansermsri T, Phumyu N, Chomchuen S, Steger HF. Screening for α -thalassemia-1 heterozygotes in expecting couples by the combination of a simple erythrocyte osmotic fragility test and a PCR based method. *Community Genet* 1999;2:26-9.
- Sanguansermsri T, Sangkapreecha C, Steger HF. HbE Screening. *Thai J Hematol Transf Med* 1998;8:215-21.
- Chamrasratanakorn T, Sanguansermsri T, Punyakeaw A. A modified microcolumn chromatography for Hb A₂ determination. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 1998;31:32-5.
- Wanapirak C, Tongsong T, Sirivatanapa P, Sanguansermsri T, et al. Prenatal strategies for reducing severe thalassemia in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 1998;60:239-44.
- Tongsong T, Wanapirak C, Sirivatanapa P, et al. Prenatal control of severe thalassemia : Chiang Mai Strategy. *Prenat Diag* 2000;20:229-34.
- Betke K, Sanguansermsri T. Cytological differentiation of blood pigments. Possibilities, results and practical application. *Munch Med Wochenschr* 1972;114:1099-104.
- VariantTM. Beta-Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Diagnostics California USA 1994;700:1-22.
- Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguansermsri T. Analysis of β -thalassemia mutations in northern Thailand using an automated fluorescence DNA sequencing technique. *Hemoglobin* 2003;27:89-95.
- Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Kunavatikul C, et al. *Thai J Obstet Gynaecol* 1996;81:79-86.
- Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R, et al. Prenatal and postnatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies by HPLC. *Clin Chem* 1998;44:704-8.
- Fucharoen S, Winichagoon P. Clinical and hematologic aspects of hemoglobin E beta-thalassemia. *Curr Opin Hematol* 2000;7:106-12.
- Rees DC, Styles L, Vichinsky EP, et al. The hemoglobin E syndromes. *Ann NY Acad Sci* 1998;850:334-43.

Prenatal Diagnosis of HbE β^0 -Thalassemia by High Performance Liquid Chromatography Analysis of Hemoglobins in Fetal Blood Samples

Sanguansermisri T, Charoenkwan P, Thanarattanakorn P, Wanapirak C*, Sirichotiyakul S*, Tongsong T*, Chanprapaph P*, Sirivantanapa P*, Saetung R, and Chamrasratanakorn T

Department of Pediatrics; *Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Background: Hemoglobin E β^0 -thalassemia (HbE β^0 -thalassemia) is a prevalent cause of severe thalassemia syndrome in Thailand, apart from β -thalassemia major and Hb Bart's hydrops fetalis. Prenatal diagnosis of the condition is therefore necessary to provide an option for couples at risk for having an affected fetus. Since most β -thalassemia mutations in Northern Thailand result in β^0 -thalassemia, the absence of Hb A in fetal blood should lead to a diagnosis for HbE β^0 -thalassemia in the fetus. **Patients and Methods:** Prenatal thalassemia screening records of pregnant women attending antenatal care clinic at Chiang Mai University hospital between January 1998 and December 2002 were reviewed. Pregnant women who were at risk for having an offspring with HbE β^0 -thalassemia were identified. Results of fetal blood hemoglobin analysis and mutation analysis were recorded. All fetal blood was obtained by cordocentesis at the gestational age between 18-22 weeks. Fetal diagnosis was made according to the hemoglobin fractionation result using automated high performance liquid column chromatography (HPLC). Automated fluorescent DNA sequencing test was performed to confirm the diagnosis in selected cases. **Results:** From 623 fetal Hb analysis records, three patterns of chromatograms were found; FE, FAE and FA. One hundred and fifty two cases demonstrated FE pattern; 151 diagnosed as HbE β^0 -thalassemia had Hb E level of $1.3 \pm 0.3\%$ and one diagnosed as homozygous Hb E had Hb E level of 2.6%. One hundred and eighty nine cases demonstrated FAE pattern; 186 diagnosed as Hb E trait had Hb A level of $2.1 \pm 1.0\%$ and Hb E level of $1.2 \pm 0.3\%$. Hb A level in all cases were higher than Hb E. Automated DNA sequencing of the remaining three cases who had lower Hb A than Hb E revealed that they were compound heterozygotes of -28 (A-G) and codon26 (G-A). Two hundred and eighty two cases had FA pattern with Hb A level ranging from 0.8-9.2%. They were diagnosed as β -thalassemia trait or normal fetus. The Hb A level could not be used to differentiate between these two conditions. Mutation analysis in each group was concordant with results analyzed by HPLC. **Summary:** Fetal hemoglobin analysis by HPLC demonstrated three patterns of chromatograms that could differentiate between HbE β^0 -thalassemia and non-disease cases. Fetus with HbE β^0 -thalassemia had FE pattern, absent Hb A and Hb E level between 0.7-1.9%. The method is effective, easy-to-use, inexpensive and is an alternative for a prenatal diagnosis of HbE β^0 -thalassemia.

Key Words : • Prenatal diagnosis • HbE β^0 -thalassemia • High performance liquid chromatography

Thai J Hematol Transf Med 2003;13:305-14.