บทความฟื้นวิชา

ความคลาดเคลื่อนในการวินิจฉัยฮีโมโกลบินผิดปกติจากเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

ปุณวัฒน์ หวังรุ่งโรจน์ และ ไข่มุกด์ ช่างศรี

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี

บทนำ

โรคธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เมื่อได้รับยีนธาลัสซีเมียหรือยีนฮีโมโกลบินผิดปกติจากพ่อและแม่ ทำให้มีอาการโลหิตจางและส่งผลกระทบต่อร่างกายหลายระบบ เนื่องจากมีความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินซึ่งมีบทบาทในการขนส่งออกซิเจนของเม็ดเลือดแดง โดยพบว่ามีความรุนแรงของอาการ ตั้งแต่ไม่มีอาการจนถึงรุนแรงถึงแก่ชีวิต พบอุบัติการณ์ได้ทั่วโลก ประเทศไทยอยู่ในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นบริเวณที่พบว่ามีความชุกและอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่มากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก

ในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียจำเป็นต้องอาศัยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นสำคัญ โดยอาจเริ่มจากการคัดกรอง เมื่อพบว่าให้ผลบวกจึงตรวจด้วยวิธีมาตรฐานหรือการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (hemoglobin typing) ร่วมกับผลการตรวจค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงเพื่อการแปลผลที่ถูกต้อง แต่ในกรณีพาหะของธาลัสซีเมีย อาจต้องใช้การตรวจทางดีเอ็นเอเพื่อยืนยันในขั้นสุดท้าย ในด้านของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินมีหลายเทคนิคหรือหลักการโดยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งแต่ละเทคนิคมีหลักการและศักยภาพในการแยกชนิดของฮีโมโกลบินต่างกัน ในขณะเดียวกันมีการค้นพบฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นจำนวนมาก และบางชนิดมีการแยกหรือมีการเคลื่อนที่ซ้อนทับกับฮีโมโกลบินปกติหรือฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่น ซึ่งอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติได้

ประสิทธิภาพของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในปัจจุบัน

วิธีอีเล็คโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

การวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิส เป็นเทคนิคแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1963 ที่ใช้สำหรับแยกชนิดและปริมาณ ฮีโมโกลบิน โดยใช้ตัวกลางที่เป็นวุ้น หรือ เซลลูโลสอซิเตท โดยมีความนิยมใช้บัฟเฟอร์ที่เป็นด่าง (pH 8.6) ทำให้โมเลกุลของฮีโมโกลบินทุกชนิดเป็นประจุลบ เมื่ออยู่ในสนามของกระแสไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในสายโกลบินจะมีผลทำให้ประจุของฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลงจึงมีการเคลื่อนที่เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับ Hb A ข้อจำกัดของ การใช้สภาวะด่างคือไม่สามารถแยกฮีโมโกลบินบางชนิดออกจากกันได้ เนื่องจากมีการเคลื่อนที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน เช่น ไม่สามารถแยก Hb A_2, Hb E, Hb C และ Hb O ออกจากกัน และ Hb D, Hb G, Hb Lepore และ Hb S ออกจากกัน ในกรณีใช้บัฟเฟอร์ที่เป็นกรด (pH 6.2) ในซิเตรทบัฟเฟอร์ มักใช้ตัวกลางที่เป็นวุ้น วิธีนี้สามารถช่วยแยกฮีโมโกลบินที่แยกด้วยสภาวะด่างไม่ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าไม่นิยมใช้บัฟเฟอร์ที่เป็นกรด เนื่องจากมีฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นจำนวนมากไม่สามารถแยกออกจาก Hb A ในกรณีตัวกลางที่เป็นเซลลูโลสอซิเตท สามารถวัดหาปริมาณได้โดยการชะฮีโมโกลบินออกมาเพื่อวัดปริมาณ ส่วนตัวกลางที่เป็นวุ้น เมื่อย้อมสีฮีโมโกลบินและทำพื้นหลังให้ใสแล้วใช้เครื่อง เดนซิโตมิเตอร์ ในการสแกนเพื่อวัดปริมาณ

วีธี อีเลคโตรโฟรีซีส เป็นวีธีที่ใช้เวลามากและสิ้นเปลืองแรงงานมาก โดยเฉพาะการวัดปริมาณโดยการชะฮีโมโกลบิน แต่ยังถือเป็นวิธีมาตรฐานของการวัดปริมาณ Hb A_2 ส่วนการสแกนด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ มีความถูกต้องและความแม่นยำต่ำ[1] โดยเฉพาะกรณีฮีโมโกลบินที่มีปริมาณน้อยเช่น Hb A_2 ซึ่งมีความสำคัญมากในการวินิจฉัยพาหะของเบต้าธาลัสซีเมีย

วิธีโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (high pressure liquid chromatography : HPLC) และโครมาโทกราฟีเหลวความดันต่ำ (low pressure liquid chromatography : LPLC)

ใช้หลักการโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ส่วนใหญ่เป็นแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิดบวก โดยคอลัมน์บรรจุอนุภาควุ้นซิลิกาขนาดเล็กเคลือบด้วยสารที่มีหมู่คาร์บอกซิลยื่น ซึ่งมีประจุลบทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ ที่เรียกว่า เฟสนิ่ง จับกับประจุบวกของ

ได้รับต้นฉบับ 25 กุมภาพันธ์ 2557 รับลงตีพิมพ์ 24 มีนาคม 2557
ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ ไข่มุกด์ ช่างศรี ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ กรุงเทพ

ฮีโมโกลบินที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ทางระบบส่งสารตัวอย่าง จากนั้นฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงของประจุสูงกว่าความแรงของประจุของฮีโมโกลบินที่จับอยู่กับ เฟสนิ่ง แต่เนื่องจากในตัวอย่างเลือดมีฮีโมโกลบินปนกันหลายชนิด แต่ละชนิดมีความแรงของประจุไม่เท่ากัน เครื่องอัตโนมัติจะมีโปรแกรมควบคุมการผสมบัฟเฟอร์ 2 ชนิดที่มี ความแรงของประจุต่างกันเพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงของความแรงของประจุที่เหมาะสม

สำหรับฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ระยะเวลาที่ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดคงอยู่ในคอลัมน์เรียกว่ารีเทนชันไทม์ (retention time, RT) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด จากนั้นฮีโมโกลบินที่ถูกชะออกมาจะถูกส่งผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อประมวลออกมาเป็นโครมาโตแกรมซึ่งแสดงฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่แยกออกมาพร้อมรายงานปริมาณโดยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูงจะมีประสิทธิภาพในการแยกสารดีกว่าวิธีโครมาโทกราฟีเหลวความดันต่ำ จึงเป็นที่นิยมมากกว่า

ปัจจุบัน โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูงอัตโนมัติเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินมากที่สุด ได้แก่เครื่องมือยี่ห้อ Bio-Rad และ Primus (Trinity Biotech) ซึ่งมีรายละเอียดการทำงานความแตกต่างกัน (Table 1)

วิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก (capillary electrophoresis : CE)

การวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก อาศัยการแยกฮีโมโกลบิน ด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูง ผ่านหลอดแก้วนำไฟฟ้าทำด้วยซิลิกาขนาดเล็กมาก ภายในบรรจุสารละลายอิเลคโตรไลท์ โดยปลายทั้งสองข้างของหลอดแก้วจุ่มอยู่ในสารละลายอิเลคโตรไลท์ เมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปจะเกิดการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ที่มีประจุสุทธิแตกต่างกันไปตามแรงขับเคลื่อนไฟฟ้า (electro osmotic flow: EOF) ทำให้สามารถแยกชนิดของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ โดยกำหนดเป็นโซนต่างๆ ตั้งแต่ 1-15 โซนโดยเทียบกับตำแหน่งของ Hb A ซึ่งเป็นตำแหน่งอ้างอิงอยู่ตรงกลาง

จุดเด่นของ CE คือสามารถแยก Hb A_2 ออกจาก Hb E ได้ ในขณะที่ HPLC/LPLC ไม่สามารถแยก Hb A_2 ออกจาก Hb E นอกจากนี้ยังสามารถแยกชนิดและปริมาณของ Hb Bart's และ Hb H ได้ดี ในขณะที่ HPLC/LPLC บางเครื่องไม่รายงานปริมาณของ Hb Bart's และ Hb H

ปัจจุบันเริ่มมีความนิยมใช้ CE มาแทน HPLC/LPLC มากขึ้น เนื่องจากรูปแบบของกราฟแสดงผลคล้ายกับอีเลคโตรโฟรีซีสชนิดด่าง แต่สามารถแยกชนิดฮีโมโกลบินได้ดีกว่า การอ่านผลง่ายกว่า แตกต่างจาก HPLC ซึ่งมีรายละเอียดของ พีคมาก ซึ่งต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมากกว่า

ความคลาดเคลื่อนของการวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทยด้วยเทคนิคหรือเครื่องมือที่แตกต่างกัน

เครื่องมือดังกล่าวข้างต้นปัจจุบันใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน แต่อย่างไรก็ตามได้มีการค้นพบฮีโมโกลบินผิดปกติจำนวนมากขึ้น ซึ่งพบว่าฮีโมโกลบินเหล่านี้อาจทับซ้อนกับฮีโมโกลบินปกติหรือ ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นได้ ทำให้เกิดปัญหาในการอ่านหรือแยกชนิดของฮีโมโกลบินได้ โดยเฉพาะอย่าง

Table 1. Comparison of the Bio-Rad Variant and Primus Ultra 2 HPLC instruments for detection of variants hemoglobin[2]

Method characteristic	Bio-Rad (Variant)	Primus (Ultra2)
1. Time	4-6 min	4 min (Quick scan)
		10 min (High resolution)
2. Program	Beta thal short, Alpha thal short	Variant
3. Calibration	Two point (A, F)	Four point (F, A, S, C)
4. Sample dilution	Predilution	On-board dilutor or manually dilute
	5 μL to 500 μL	7.5 μL to 1,000 μL
5. Temperature	30-35°C	Room temperature
6. Normal peak	5 peaks	10-12 peaks
7. Identified peak	Retention time	Relative retention time
8. Band measurement	Beta thal short program : fast band not measured	Fast band measured

ยิ่งฮีโมโกลบินที่พบในประเทศไทยสามารถแยกได้ (Table 2.)

จากข้อมูลจากตารางแสดงฮีโมโกลบินผิดปกติซึ่งสามารถแยกได้ด้วยเทคนิคหรือเครื่องมือหนึ่ง แต่ไม่สามารถแยกได้ด้วยอีกเทคนิคหรือเครื่องมือ รวมทั้งฮีโมโกลบินผิดปกติมีโอกาสที่จะซ้อนทับกับฮีโมโกลบินปกติ หรือ ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่น ซึ่งอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวินิจฉัย ได้ ดังนี้

Hb E เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีรายงานการพบในประเทศไทยมากที่สุด ด้วยเทคนิคอีเลคโตรโฟรีซีส Hb E จะอยู่ตำแหน่งเดียวกับ Hb A_2 โดยจะถือว่าถ้าในตำแหน่งนี้มีปริมาณฮีโมโกลบินมากกว่าร้อยละ 10 ให้ถือว่าเป็น Hb E ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวไม่สามารถแยกระหว่าง Hb E และ Hb A_2 ยกเว้นเครื่อง Ultra2 สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Hb E และ Hb A_2 ถึงแม้ไม่สามารถแยกขาดออกจากกัน ส่วนเทคนิค CE มี จุดเด่นที่สามารถแยกระหว่าง Hb E และ Hb A_2 ได้ ปริมาณของ Hb E (รวมกับ Hb A_2) ในผู้ที่เป็นพาหะของ Hb E ช่วยบ่งชี้ว่ามีแอลฟาธาลัสซีเมียร่วมด้วย โดยใช้เกณฑ์ที่น้อยกว่าร้อยละ 25 ดังนั้นในกรณีที่สามารถแยก Hb E ออกจาก Hb A_2 เมื่อต้องการใช้วินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียยังคงใช้ผลรวมของ Hb E และ Hb A_2 อย่างไรก็ตามจะมีประโยชน์ในกรณีผู้ที่มี Hb type เป็น A_2A แต่ได้รับเลือดจากผู้ที่มี Hb E ทำให้มี Hb E ปนมาในปริมาณเล็กน้อยซึ่งไม่ใช่ Hb A_2 ทำให้ไม่แปลผลผิดเป็นพาหะของเบต้าธาลัสซีเมีย

Hb C เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีรายงานการพบในประเทศไทยน้อย ด้วยวิธี อีเลคโตรโฟรีซีส Hb C จะซ้อนทับกับตำแหน่ง Hb A_2 ซึ่งอยู่ตำแหน่งเดียวกับ Hb E ทำให้ไม่สามารถแยกว่าเป็น Hb C ได้ทำให้มีการรายงานเป็น Hb E แต่สำหรับเทคนิค HPLC, LPLC และ CE สามารถแยกออกจาก Hb E ได้ เนื่องจากผู้ที่เป็นพาหะและโฮโมไซโกทของ Hb C ไม่มีอาการผิดปกติหรือโลหิตจางแต่หากผู้ที่เป็นพาหะของ Hb C ได้รับยีนของ Hb S จะทำให้มีอาการเหมือนผู้ที่เป็นโฮโมไซโกทของ Hb S ซึ่งมีอาการโลหิตจางรุนแรง แต่ ฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งสองชนิดพบได้น้อยในคนไทย

Hb Hekinan เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อย ไม่สามารถแยกออกจาก Hb A ได้ด้วยเทคนิค อีเลคโตรโฟรีซีส และ CE ส่วนเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวจะอยู่ใกล้ Hb A เมื่อใช้เครื่อง Variant พบว่าทำให้ลักษณะ พีค ของ Hb A ผิดปกติไป ผู้ทำการตรวจวิเคราะห์ต้องใช้ความสังเกตุ แต่ในกรณีผู้ที่มี Hb E ร่วมด้วยทำให้ปริมาณของ Hb A ลดลงหรือ พีค ของ Hb A ผอมลงทำให้ Hb Hekinan แยกออกมาจาก Hb A (แต่ไม่แยกออกจากกัน) ทำให้สังเกตุง่ายขึ้น ในขณะที่เครื่อง Ultra2 สามารถแยก Hb Hekinan ออกจาก Hb A ได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม Hb Hekinan ไม่ได้ทำให้การสร้างสายแอลฟาโกลบินลดลงแต่อย่างใด การตรวจไม่พบจึงได้ก่อผลเสียในการวินิจฉัยหรือการรักษา

Table 2. Performance of different technique or instrument for separate abnormal hemoglobin found in Thailand

Separation of abnormal hemoglobin			Technique (instrument)					Reference
			Electro-phoresis (Alkaline)	HPLC (Bio-Rad)	HPLC (Primus)	LPLC (Drew)	CE (Sebia)	
1.	Hb E	Hb C	No[3]	Yes[3]	Yes[4]	Yes[3]	Yes[4]	3, 4
2.	Hb E	Hb A2	No[1]	No[1,2]	No[2]	No[5]	Yes[6,7]	1, 2, 5-7
3.	Hb Hekinan	Hb A	No[8,9]	No[7,9,10]	Yes[11]	N/A	No[11]	8-11
4.	Hb Lepore	Hb A2(E)	Yes[12]	No[13]	Yes[4]	No[14]	Yes[15]	4, 12-15
5.	Hb Pak num po	Hb A	No[16]	N/A	N/A	No[16]	N/A	16
6.	Hb Constant Spring	Hb Pakse	No[17]	No[18]	N/A	No[17]	No[19]	17-19
7.	Hb Dhon buri	Hb A	No[20]	No[20]	N/A	N/A	N/A	20
8.	Hb Malay	HbA	No[21]	No[22]	N/A	N/A	No[19]	19, 21, 22
9.	Hb Tak	Hb F	Yes[23]	Yes[23,24]	Yes	Yes	No[10,24]	19, 23, 24
10.	Hb Q-Thailand	Hb F	Yes[25]	Yes[24]	N/A	N/A	No[24]	24, 25
11.	Hb Kodaira II	Hb A	No[26]	Yes[26]	N/A	N/A	N/A	26
12.	Hb New York (Hb Kaohsiung)	Hb A	Yes[27,28]	No[27,28]	N/A	N/A	Yes[29]	27-29
13.	Hb J Bangkok	Hb Pygros	No[30]	N/A	N/A	Yes[30]	N/A	30
14.	Hb Siam, Hb Queens	Hb S	No[31]	N/A	N/A	No[31]	Yes[19]	19, 31

Hb Lepore เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อย โดยเทคนิคอีเลคโตรโฟรีซีส และ CE จะอยู่ระหว่าง Hb A และ Hb A_2 ส่วนเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวด้วยเครื่อง Variant พบว่าจะอยู่ในตำแหน่ง Hb E หรือ Hb A_2 ทำให้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ซึ่งอาจทำให้แปลผลเป็น Hb E ในขณะที่เทคนิค CE สามารถแยกออกจาก Hb E และ Hb A_2 ได้ ซึ่ง Hb Lepore เป็นความผิดปกติของสายเดลต้าและเบต้าโกลบิน หากร่วมกับเบต้าธาลัสซีเมียทำให้มีอาการโลหิตจางปานกลางได้

Hb Pak Num Po เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อย มีคุณสมบัติเป็นแอลฟาธาลัสซีเมียทำให้การสร้างสายแอลฟาโกลบินลดลง ปัจจุบันพบว่าที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค LPLC, อีเลคโตรโฟรีซีส รวมทั้ง ไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิง (isoelectric focusing, IEF) ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดนี้เมื่อพบร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ทำให้เป็น Hb H disease ที่มีอาการโลหิตจางรุนแรง

Hb Constant Spring (Hb CS) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้บ่อยรองจาก Hb E เนื่องจากเป็นฮีโมโกลบินที่ไม่คงตัวและมีปริมาณน้อยเพียงประมาณร้อยละ 1 ในผู้ที่เป็นพาหะ จึงมีโอกาสไม่พบ โดยเมื่อใช้วิธีอีเลคโตรโฟรีซีส หากใช้ตัวกลางเป็นวุ้นจะใช้ ปริมาณตัวอย่างฮีโมไลเสท มากกว่าตัวกลางเซลลูโลสอซิเตท ทำให้ตรวจพบ Hb CS ได้ดีกว่า ส่วนวิธี HPLC พบว่ามีโอกาสตรวจพบได้น้อยโดยเฉพาะเมื่อเทียบกับวิธี CE ดังนั้นกลุ่ม อีเลคโตรโฟรีซีส จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจจับ Hb CS ได้ดีกว่ากลุ่ม เทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวอย่างไรก็ตาม ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Hb CS และ Hb Pakse แต่เนื่องจากฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งสองชนิดไม่ได้ก่อให้เกิดความรุนแรงของพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน จึงไม่ได้ก่อให้เกิดผลเสียในการวินิจฉัยหรือการรักษา เพียงแต่อาจให้ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาคลาดเคลื่อนไป

Hb Dhon buri เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติของสายเบต้าและทำให้มีการสร้างสายเบต้าโกลบินลดลงโดยมีคุณสมบัติเป็นเบต้าธาลัสซีเมีย ดังนั้นถึงแม้ว่าการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเทคนิคต่างๆ ไม่สามารถตรวจพบได้แต่เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นเบต้าธาลัสซีเมียบวก จึงตรวจพบถึงความผิดปกติได้โดยพบว่า Hb A_2 สูงกว่าปกติเหมือนพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียทั่วไป

Hb Malay เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติของสายเบต้าและทำให้มีการสร้างสายเบต้าโกลบินลดลงโดยมีคุณสมบัติเป็น เบต้าธาลัสซีเมียบวก ดังนั้นถึงแม้ว่าการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเทคนิคต่างๆ ไม่สามารถตรวจพบได้แต่เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น เบต้าธาลัสซีเมียบวก จึงตรวจพบถึงความผิดปกติโดยพบว่า Hb A_2 สูงกว่าปกติเหมือนพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียทั่วไป แต่หากพบร่วมกับ Hb E ทำให้มีรูปแบบฮีโมโกลบินเป็น EFA อาจทำให้สับสนกับพาหะของ Hb E แต่พบว่ามีสัดส่วนของฮีโมโกลบินผิดปกติไป โดยพบว่ามีปริมาณ Hb E ร้อยละ 53.6 Hb F ร้อยละ 11.8 และ Hb A ร้อยละ 34.6

Hb Tak และ Hb Q-Thailand เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติของสายเบต้าและแอลฟาตามลำดับ สามารถแยกจากฮีโมโกลบินปกติได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลว และ อีเลคโตรโฟรีซีส แต่พบว่ามีการซ้อนทับกับ Hb F เมื่อใช้เทคนิค CE ดังนั้น ในกรณีที่พบว่า Hb F สูงด้วยเทคนิค CE ควรใช้เทคนิคอื่นเพื่อตรวจสอบ

Hb Kodaira II เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติของสายเบต้า มีคุณสมบัติจับออกซิเจนได้แน่นกว่า Hb A จึงทำให้มีภาวะ polycythemia ไม่สามารถแยกออกจาก Hb A ด้วยเทคนิค อีเลคโตรโฟรีซีส แต่สามารถแยกออกจาก Hb A ด้วยวิธี HPLC

Hb New York เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติของสายเบต้าผู้ที่เป็นพาหะหรือผู้ที่เป็นพาหะร่วมกับเบต้าธาลัสซีเมียไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพ ไม่สามารถแยกออกจาก Hb A ด้วยเทคนิค อีเลคโตรโฟรีซีส และ HPLC สามารถแยกจาก Hb A ด้วยเทคนิค CE

Hb J Bangkok และ Hb Pygros เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติของสายเบต้า เมื่อใช้เทคนิคอีเลคโตรโฟรีซีสพบว่าฮีโมโกลบินทั้งคู่จะวิ่งอยู่หน้า Hb A แต่อยู่ต่ำกว่า Hb Bart's ด้วยระยะทางที่ใกล้เคียงกัน แต่สามารถพบความแตกต่างได้ด้วยเทคนิค HPLC หรือ LPLC

Hb Siam และ Hb Queens เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติของสายแอลฟา ด้วยเทคนิคอีเลคโตรโฟรีซีส และ LPLC จะอยู่ตำแหน่งเดียวกันกับ Hb S ทำให้เข้าใจว่าอาจเป็น Hb S ในขณะสามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยเทคนิคCE อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงเชื้อชาติ หากป็นคนไทยโอกาสที่จะเป็น Hb Siam และ Hb Queens มากกว่า

สรุป

เทคนิคหรือเครื่องมือที่ใช้ในการแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินต่างมีจุดเด่น ข้อดี ข้อด้อยที่แตกต่างกันดังนี้

อีเลคโตรโฟรีซีส เป็นเทคนิคแรกที่ใช้ในการแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน มีจุดเด่น ที่สามารถแยกฮีโมโกลปกติและผิดปกติได้หลายชนิด เครื่องมือมีหลักการที่ไม่ซับซ้อน สามารถแยกชนิดหรือตรวจพบ Hb H และ Hb Bart's ได้ดี แต่มีข้อเสียในกรณีที่เป็นฮีโมโกลบินที่มีปริมาณน้อยเมื่อวัดปริมาณด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ พบว่ามีความแม่นยำหรือถูกต้องต่ำ ในกรณีฮีโมโกลบินที่แยกได้อยู่ใกล้กันต้องอาศัยทักษะและความชำนาญสูง เป็นเทคนิคที่สิ้นเปลืองเวลาและแรงงานมาก

HPLC เป็นเทคนิคที่เป็นระบบอัตโนมัติ จึงมีข้อดีที่ไม่สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน สามารถแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินได้มีประสิทธิภาพสูง มีความถูกต้องแม่นยำสูง แต่มีข้อเสียที่รูปแบบฮีโมโกลบินที่แยกได้มีจำนวนพีค ค่อนข้างมาก ต้องอาศัยการฝึกฝนหรือความชำนาญในการอ่าน อาจมีปัญหาสำหรับ Hb Bart's และ Hb H ซึ่งบางเครื่องไม่รายงานปริมาณเช่น Variant (Bio-rad) ส่วนเครื่อง Ultra2 (Primus) พบว่า Hb H จะซ้อนทับกับ Hb A1c ส่วน LPLC มีข้อดีข้อเสียคล้ายกับ HPLC แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า

CE เป็นเทคนิคระบบอัตโนมัติจึงมีข้อดีที่ประสิทธิภาพ ความถูกต้องแม่นยำสูง เป็นเทคนิคที่สามารถทำงานได้ปริมาณมากที่ดีที่สุด ส่วนรูปแบบฮีโมโกลบินที่แยกได้อ่านง่ายคล้ายกับ อีเลคโตรโฟรีซีสสภาวะด่าง แต่มีประสิทธิภาพการแยกชนิดฮีโมโกลบินได้ดีกว่า จุดเด่นที่สำคัญคือสามารถแยก Hb E และ Hb A_2 ได้ อาจมีข้อเสียกรณีที่ตัวอย่างที่ไม่มี Hb A ทำให้ขาดตำแหน่งอ้างอิง ต้องทำซ้ำด้วยการผสมกับตัวอย่างที่มี Hb A

สรุป ไม่มีเทคนิคหรือเครื่องมือชนิดใดชนิดหนึ่งซึ่งสามารถตรวจจับฮีโมลบินผิดปกติได้ทุกชนิด ความรู้ความเข้าใจในข้อจำกัดของแต่ละเทคนิคจะทำให้สามารถลดความคลาดเคลื่อนในการวินิจฉัยหรือรายงานชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินโดยเฉพาะฮีโมโกลบินผิดปกติ ในทางกลับกันสามารถใช้เทคนิคที่แตกต่างกันช่วยในการตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติได้มากขึ้นหรือช่วยยืนยันชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติได้

เอกสารอ้างอิง

1. *Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. Clin Chem 2000;46:1284-90.*
2. *Gosselin RC, Carlin AC, Dwyre DM. Comparison of the BioRad Variant and Primus Ultra2 high-pressure liquid chromatography (HPLC) instruments for the detection of variant hemoglobins. Int J Lab Hematol 2010;33:159-67.*
3. *Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Siriratmanawong N, Surapot S, Fucharoen S. Molecular characterization of hemoglobin C in Thailand. Am J Hematol 2001;67:189-93.*
4. *Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou CN, Bak R. Comparison of Sebia Capillarys capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. Am J Clin Pathol 2008;130:824-31.*
5. *Sanguansermsri T. Diagnosis of Severe Thalassemia Trait Using the Low Pressure Liquid Chromatography Hb Gold Drew System. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 1999;32:144-9.*
6. *Winichagoon P, Svasti S, Munkongdee T, Chaiya W, Boonmongkol P, Chantrakul N, et al. Rapid diagnosis of thalassemias and other hemoglobinopathies by capillary electrophoresis system. Transl Res 2008;152:178-84.*
7. *Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verweij M, de Korte M, Baylan U, Harteveld CL, et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. Int J Lab Hematol 2009;3:484-95.*
8. *Harano T, Harano K, Imai N, Ueda S, Seki M. An electrophoretically silent hemoglobin variant, Hb Hekinan [alpha 27(B8)Glu----Asp] found in a Japanese. Hemoglobin 1988;12:61-5.*
9. *Chunpanich S, Ayukarn K, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Laboratory diagnosis of a compound heterozygosity for Hb Hekinan [alpha27(B8) Glu-Asp] and a deletional alpha-thalassaemia 2 in Thailand. Clin Lab Haematol 2004;26:355-8.*
10. *Fucharoen S, Changtrakun Y, Ratanasiri T, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Complex interaction of Hb Hekinan [alpha27(B8) Glu-Asp] and Hb E [beta26(B8) Glu-Lys] with a deletional alpha-thalassemia 1 in a Thai family. Eur J Haematol 2003;70:304-9.*
11. *Shih HC, Shih MC, Chang YC, Peng CT, Chang TJ, Chang JG. Hb Hekinan in a Taiwanese subject: a G-->T substitution at codon 27 of the alpha1-globin gene abolishes an HaeIII site. Hemoglobin 2007;31:495-8.*
12. *Ropero P, Gonzalez FA, Sanchez J, Anguita E, Asenjo S, Del Arco A, et al. Identification of the Hb Lepore phenotype by HPLC. Haematologica 1999;84:1081-4.*
13. *Phylipsen M, Gallivan MV, Arkesteijn SG, Harteveld CL, Giordano PC. Occurrence of common and rare delta-globin gene defects in two multiethnic populations: thirteen new mutations and the significance of delta-globin gene defects in beta-thalassemia diagnostics. Int J Lab Hematol 2011;33:85-91.*
14. *Viprakasit V, Pung-Amritt P, Suwanthon L, Clark K, Tanphaichtr VS. Complex interactions of deltabeta hybrid haemoglobin (Hb Lepore-Hollandia) Hb E (beta(26G-->A)) and alpha+ thalassaemia in a Thai family. Eur J Haematol 2002;68:107-11.*
15. *Chaibunruang A, Fucharoen G, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. Hemoglobin Lepore EF Bart's disease: a molecular, hematological, and diagnostic aspects. Ann Hematol 2011;90:1337-40.*
16. *Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Veerakul G, Chinchang W, Petrarat S, Pung-Amritt P, et al. Co-inheritance of Hb Pak Num Po, a novel alpha1 gene mutation, and alpha0 thalassemia associated with transfusion-dependent Hb H disease. Am J Hematol 2004;75:157-63.*
17. *Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Pung-Amritt P, Petrarat S, Suwantol L, Fisher C, et al. Clinical phenotypes and molecular characterization of Hb H-Pakse disease. Haematologica 2002;87:117-25.*
18. *Singsanan S, Fucharoen G, Savongsy O, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Molecular characterization and origins of Hb Constant Spring and Hb Pakse in Southeast Asian populations. Ann Hematol 2007;86:665-9.*
19. *Fucharoen G, Srivorakun H, Singsanan S, Fucharoen S. Presumptive diagnosis of common haemoglobinopathies in Southeast Asia*

using a capillary electrophoresis system. Int J Lab Hematol 2011;33:424-33.

20. *Viprakasit V, Chinchang W. Two independent origins of Hb Dhonburi (Neapolis) [beta 126 (H4) Val-->Gly]: an electrophoretically silent hemoglobin variant. Clin Chim Acta 2007;376:179-83.*
21. *Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Surapot S. Molecular characterization of thalassemia intermedia with homozygous Hb Malay and Hb Malay/HbE in Thai patients. Haematologica 2001;86:657-8.*
22. *Ma S, Chow E, Chan A, Kung N, Waye J, Chan L, et al. Beta-thalassemia intermedia caused by compound heterozygosity for Hb Malay (beta codon 19 AAC-->AGC; asn-->Ser) and codons 41/42 (-CTTT) beta(0)-thalassemia mutation. Am J Hematol 2000;64:206-9.*
23. *Charoenkwan P, Thanarattanakorn P, Chaovaluksakul S, Sittipreechacharn S, Sae-Tang R, Sanguansermsri T. Hematological and molecular characterization of beta-thalassemia/Hb Tak compound heterozygote. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003;34:415-9.*
24. *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;34:161-4.*
25. *Zheng W, Liu Y, Chen D, Rong K, Ge Y, Gong C, et al. Complex interaction of Hb Q-Thailand and Hb E with alpha(0)-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in a Chinese family. Ann Hematol 2010;89:883-8.*
26. *Ngiwsara L, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoen S, Svasti J. Hb Kodaira II [beta146(HC3)His --> Gln] detected in Thailand. Hemoglobin 2003;27:37-9.*
27. *Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60,000 samples in a clinical diagnostic laboratory. Clin Chem 2004;50:1736-47.*
28. *Lee AC, Ma ES, Chan AY, Szeto SC, Chan LC. Double heterozygosity for Hb New York [beta 113 GTG-->GAG; VAL-->GLU] and beta degrees-thalassemia mutations manifests as a thalassemia trait. Pediatr Hematol Oncol 2008;25:227-31.*
29. *Li DZ, Zhou JY, Xie XM, Liao C. Association of Hb New York with Hb E and alpha(0)-thalassemia in a Chinese woman identified by Sebia CapillaryS2 system. Hemoglobin 2012;36:157-60.*
30. *Fucharoen S, Singsanan S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G. Molecular and haematological characterization of compound Hb E/Hb Pyrgos and Hb E/Hb J-Bangkok in Thai patients. Clin Lab Haematol 2005;27:184-9.*
31. *Fucharoen S, Singsanan S, Hama A, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Rapid molecular characterization of Hb Queens and Hb Siam: two variants easily misidentified as sickle Hb. Clin Biochem 2007;40:137-40.*