นิพนธ์ต้นฉบับ

การเตรียมน้ำเลือดอย่างง่ายเพื่อใช้ทดสอบหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้า

ชวดี นพรัตน์[1]
ละออง ทองคง[2]
พเยาว์ อินทนาคม[2]
นวลตา นัคราบัณฑิตย์[2]

Simplified hemolysate preparation for identification and quantitation of hemoglobin by electrophoresis

Nopparatana C, Thongkong L, Inthanakom P, Nakkarabandit N.
Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand

Songkla Med J 2008;26(3):275-282

Abstract:

A simplified hemolysate-preparation reagent was composed of 1 g of ethylenediamine tetraacetic acid and 0.1 g of saponin dissolved in 500 ml of distilled water. The hemolysate was prepared by adding equal volumes of the reagent into normal-saline-washed packed red cells and mixing for five minutes. The hemolysates of 109 samples included 24 normal individuals, 21 beta-thalassemia trait, 23 heterozygotes of hemoglobin E, 21 hemoglobin H disease and 20 cord blood samples with hemoglobin Bart's, which were tested by cellulose acetate electrophoresis to identify hemoglobin types and their concentration. The results were compared with those obtained from standard preparation method using a paired-t-test. There was no significant difference of the hemoglobin concentration from the two preparation methods (p=0.1718). There was good

[1]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก) นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ [2]ป.พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
รับต้นฉบับวันที่ 18 กรกฎาคม 2550 รับลงตีพิมพ์วันที่ 10 มีนาคม 2551

correlations between the two methods of hemolysate preparation with a correlation coefficient of 0.9887 and a regression line of Y=0.9678X+0.1633. The cellulose acetate electrophoresis of simplified hemolysate showed clear separation of each hemoglobin bands. We concluded that the simplified hemolysate preparation could be used in the laboratory for identification and quantification of hemoglobin. The advantages of this hemolysate preparation method are it is simple to perform and contact with chemical hazard can be avoided.

Key words: *hemolysate preparation, hemoglobin electrophoresis, thalassemia, toluene*

บทคัดย่อ:

น้ำยาสำหรับเตรียมน้ำเลือดอย่างง่าย (simplified hemolysate-preparation) ประกอบด้วย ethylene diamine tetraacetic acid disodium 1 กรัม และ saponin 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. นำมาใช้เตรียมน้ำเลือด (hemolysate) โดยผสมน้ำยา 1 ส่วน กับเลือด 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ 5 นาที แล้วนำมามาแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้า (cellulose acetate electrophoresis) เปรียบเทียบชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินที่แยกได้กับวิธีการเตรียมน้ำเลือดตามวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษากลุ่มตัวอย่างจำนวน 109 ราย แยกเป็นรายที่ให้ผลตรวจปกติ 24 ราย พาหะของบีตาธาลัสซีเมีย 21 ราย พาหะของฮีโมโกลบินอี 23 ราย โรคฮีโมโกลบินเอช 21 ราย และเด็กแรกคลอดที่มีฮีโมโกลบินบาร์ท 20 ราย พบว่าปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่ทดสอบได้จากน้ำเลือดที่เตรียมทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.1718, = 0.05) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) = 0.9896 และสมการถดถอยเชิงเส้น Y=0.9678X+0.1633 เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพของแถบฮีโมโกลบินที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท พบว่าแยกแถบของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดได้ชัดเจนที่ตำแหน่งตรงกับสารควบคุม การเตรียมน้ำเลือดอย่างง่ายจึงสามารถนำมาใช้ทดแทนวิธีเดิมได้ โดยมีข้อดีคือ ช่วยลดขั้นตอนในการเตรียม และหลีกเลี่ยงการสัมผัสสารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพได้

คำสำคัญ: *การเตรียมน้ำเลือด, วิธีแยกฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้า, ธาลัสซีเมีย, โทลูอีน*

บทนำ

ธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรม ทำให้การสร้างสายโกลบิน (globin chain) ได้น้อยกว่าปรกติ หรือไม่สามารถสร้างได้เลย[1] ธาลัสซีเมียที่สำคัญมี 2 กลุ่ม แบ่งตามชนิดของสายโกลบินคือ กลุ่มอัลฟ่าธาลัสซีเมีย (α-thalassemia) และกลุ่มบีต้าธาลัสซีเมีย (β-thalassemia) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของความผิดปกติอีกกลุ่มหนึ่งคือความผิดปกติที่ทำให้สูตรโครงสร้างของสายโกลบินเปลี่ยนไปเรียกว่า ฮีโมโกลบินผิดปกติ (abnormal hemoglobin) ซึ่งบางชนิดมีการสร้างลดลงด้วยทำให้มีผลเหมือนธาลัสซีเมีย โรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติพบได้บ่อยในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทยมีผู้ป่วยด้วยโรคธาลัสซีเมียประมาณร้อยละ 1 ของประชากรทั้งประเทศ และมีผู้ที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียหรือฮีโมโกลบินผิดปกติร้อยละ 30-40 ของประชากรทั้งหมด[1-2] ปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมที่จะรักษาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียให้หายขาด การรักษาโดยทั่วไปเป็นการรักษาตามอาการโดยการให้เลือดและยาขับเหล็ก ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงและไม่สามารถรักษาผู้ป่วยให้หายขาดได้ เป็นปัญหาทั้งทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นการป้องกันและควบคุมไม่ให้มีทารกเกิดใหม่ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่จะแก้ไขปัญหาเหล่านี้ และสามารถทำได้โดยการตรวจหาพาหะในหญิงมีครรภ์ ให้คำแนะนำในการตั้งครรภ์และตรวจทารกในครรภ์[3]

การตรวจหาพาหะของโรคธาลัสซีเมียทางห้องปฏิบัติการเริ่มตั้งแต่การตรวจกรองอย่างง่าย คือ การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.36 ร่วมกับการตรวจดูตะกอนของฮีโมโกลบินผิดปรกติในน้ำยาไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล[4-5] หากพบรายที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบอย่างใด-อย่างหนึ่ง ต้องนำไปตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานคือ การแยกฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้า (hemoglobin electrophoresis)[4] เพื่อแยกชนิดและวัดปริมาณของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด หรือใช้

เครื่องมืออัตโนมัติที่ใช้หลักการโครมาโตกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) ที่สามารถแยกทั้งชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินจากตัวอย่างตรวจได้ โดยไม่ต้องจัดเตรียมน้ำเลือดก่อน ช่วยให้ทำการทดสอบได้สะดวกรวดเร็วและแม่นยำในการวินิจฉัย[6-7] แต่จากประสบการณ์การใช้งานของผู้วิจัยพบว่ายังมีข้อจำกัดในการใช้เครื่องอัตโนมัติหลักการโครมาโตกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง คือ ไม่สามารถวัดได้ครอบคลุมทุกชนิดของฮีโมโกลบิน เช่น ชุดคอลัมน์ β-thal short ของเครื่อง VARIANT (Biorad)[8] ที่ไม่สามารถรายงานผลฮีโมโกลบินเอช หรือฮีโมโกลบินบาร์ทได้ ต้องทำการทดสอบซ้ำด้วยชุดคอลัมน์ α-thal short ทำให้เป็นการเพิ่มต้นทุนและเวลาในการทดสอบมากขึ้น ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงยังคงใช้วิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท เพื่อช่วยในการตรวจยืนยันหลังจากพบว่ามียอด (peak) ของฮีโมโกลบินเอช หรือฮีโมโกลบินบาร์ทจากผลโครมาโตแกรม (chromatogram) ของเครื่องอัตโนมัติดังกล่าว

วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปทดสอบโดยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยนำเลือดของผู้ป่วยมาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ หลังจากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยน้ำกลั่น และสกัดส่วนที่เป็นเศษเซลล์และโปรตีนต่าง ๆ เพื่อให้ได้ส่วนที่เป็นน้ำเลือด (hemolysate) ก่อนนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า การสกัดส่วนเศษเซลล์และโปรตีนต่าง ๆ ต้องใช้สารประกอบโทลูอีน (toluene) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มออร์แกนิคโซลเว้น (organic solvent) มาตกตะกอนโปรตีนและกำจัดทิ้งไป ปัญหาที่เกิดขึ้น คือ สารโทลูอีนเป็นสารเคมีอันตรายมีกลิ่นเหม็น ระคายเคืองกับระบบทางเดินหายใจ ผิวหนัง และระบบทางเดินอาหาร มีผลทำลายตับ ไต กระเพาะปัสสาวะ และสมอง[9] ผู้ปฏิบัติงานจึงต้องปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวัง ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงสารเคมีอันตรายดังกล่าว และเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาวิธีเตรียมน้ำเลือดอย่างง่ายเปรียบเทียบกับวิธีเตรียมมาตรฐาน โดยทดสอบแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดที่เจาะจากต้นแขนปริมาณ 4.0 มล. ใส่ขวดที่มีสาร dipotassium ethylene diamine tetraacetate เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำมาตรวจวัดค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (red blood cell indices) ประกอบด้วยค่า hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), Red blood cell count (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH) และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) และ red cell distribution width (RDW) โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ ADVIA 120 (Technicon, USA)[10] และทดสอบแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า จำนวน 109 ราย แบ่งเป็นกลุ่มที่ให้ผลตรวจฮีโมโกลบินปกติ 24 ราย พาหะของฮีโมโกลบินอี 23 ราย พาหะของเบตาธาลัสซีเมีย 21 ราย ฮีโมโกลบินเอช 21 ราย และเด็กแรกคลอดที่มีฮีโมโกลบินบาร์ท 20 ราย รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของดัชนีเม็ดเลือดแดง ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Advia 120 แยกตามกลุ่มตัวอย่าง 5 กลุ่ม

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวน (ราย)		Hb (gm/dL)	Hct (%)	RBC (10^6/uL)	MCV (fL)	MCH (gm/dL)	MCHC (%)	RDW (%)
Normal	24	X	12.69	37.83	4.19	90.79	30.40	33.42	13.91
		SD	1.34	4.11	0.54	4.43	1.91	0.93	1.09
β - thal trait	21	X	10.14	31.62	4.93	66.86	21.24	31.80	16.94
		SD	1.98	5.95	1.11	4.19	1.79	1.35	2.38
Hb E trait	23	X	11.89	35.74	4.46	80.04	26.71	33.43	14.73
		SD	1.53	4.66	0.59	4.08	1.34	0.85	1.62
Hb H disease	21	X	8.30	28.52	4.39	66.05	19.05	28.95	22.12
		SD	2.18	7.36	1.23	10.21	2.88	2.11	3.35
Bart's AF	20	X	14.09	42.95	4.41	95.10	31.21	32.83	15.49
		SD	2.70	8.45	0.81	11.05	3.59	1.06	2.10

การเตรียมน้ำเลือด

การเตรียมน้ำเลือดด้วยวิธีมาตรฐาน[4] นำเลือดมาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ผสมให้เม็ดเลือดแดงแตก เติมโทลูอีนปริมาตร 1 ใน 4 ของน้ำเลือด เขย่าให้เข้ากันอย่างแรง เป็นเวลา 5 นาที จนส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดแยกชั้นบนที่เป็นโทลูอีนรวมกับตะกอนโปรตีนออกทิ้ง เหลือแต่น้ำเลือดสีแดงใส กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ก่อนนำไปใช้ทดสอบ

การเตรียมน้ำเลือดอย่างง่าย หลังจากการปั่นล้างเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง เติมสารเตรียมน้ำเลือดอย่างง่าย (ประกอบด้วย ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA 1.0 กรัม และ saponin 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล.) ลงในเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปริมาตรเท่ากัน ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ 1 นาที ได้น้ำเลือดสีแดงใส แล้วนำไปใช้ทดสอบ

การทดสอบแยกชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้า

เจือจางน้ำเลือดด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ประมาณ 3-4 กรัม/ดล. นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate, Titan IIIH) โดยใช้ Tris EDTA borate pH 8.6 เป็น buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 280 โวลท์ นาน 15 นาที แล้วนำมาย้อมสี ponsuae S และอ่านชนิดของแถบฮีโมโกลบินตามตำแหน่งที่ปรากฏโดยเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ทำควบคู่กัน ปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ตรวจวัดได้ด้วยการล้างออกจากแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท หลังจากแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยตัดแถบฮีโมโกลบินแต่ละชนิดมาชะล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร นำมาคำนวณความเข้มข้นของฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ เป็นร้อยละของความเข้มข้นรวม

การประเมินคุณภาพของวิธีเตรียมน้ำเลือดอย่างง่าย

เปรียบเทียบผลการตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินจากตัวอย่างที่เตรียมได้จากวิธีเตรียมน้ำเลือดอย่างง่ายกับวิธีเตรียมน้ำเลือดมาตรฐาน โดยตรวจสอบความสอดคล้องของการอ่านผลชนิดของแถบฮีโมโกลบินที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยสถิติ Kappa statistic agreement ทดสอบสมมติฐานความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย paired-t test หาความสัมพันธ์ของปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation; R) และสมการถดถอยเชิงเส้น (regression line) และแสดงความสอดคล้อง (agreement) ของการทดสอบด้วยวิธี Bland_Altman plot

ผลการศึกษา

นำน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่ายและเตรียมโดยวิธีมาตฐานมาทดสอบแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตทพบว่า ตัวอย่างที่เตรียมจากทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน คือ มีความคมชัด แยกจากกันชัดเจนและตำแหน่งที่ปรากฏของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดนั้นตรงกับตัวอย่างควบคุมที่ทำควบคู่กันดังแสดงในรูปที่ 1 และเปรียบเทียบการอ่านผลชนิดของแถบฮีโมโกลบินที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าจากตัวอย่าง 109 ราย จากน้ำเลือดที่เตรียมทั้งสองวิธีพบว่าอ่านผลได้ตรงกันทุกราย ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยค่าความสอดคล้อง (kappa statistic agreement) K=1.00

ผลทดสอบเปรียบเทียบปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่ตรวจวัดได้จากน้ำเลือดทั้งสองวิธี แยกตามกลุ่มตัวอย่างทั้ง 5 กลุ่มพบว่าการทดสอบจากน้ำเลือดมาตรฐาน ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินเอสองในกลุ่มคนปกติเท่ากับ 3.02±0.36 และกลุ่มพาหะบีตาธาลัสซีเมียเท่ากับ 5.28±0.78 ปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินอีในกลุ่มพาหะของฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 25.67±2.86 ปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินเอชในกลุ่มโรคฮีโมโกลบินเอชเท่ากับ 10.70±5.85 และปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินบาร์ทในเด็กแรกคลอดเท่ากับ 6.09±2.40 ในขณะที่การทดสอบในน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่ายจากกลุ่มตัวอย่างทั้ง 5 กลุ่มได้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 2.98±0.42, 5.37±0.84, 26.38±1.40, 10.72±5.91 และ 6.15±2.52 ตามลำดับ

เมื่อนำค่าร้อยละของฮีโมโกลบินที่ได้จากการทดสอบน้ำเลือดที่ได้จากการเตรียมทั้งสองวิธีจากตัวอย่างแต่ละกลุ่มแยกเป็นกลุ่มคนปกติ พาหะบีตาธาลัสซีเมีย พาหะฮีโมโกลบินอี ฮีโมโกลบินเอช และเด็กแรกคลอดที่มีฮีโมโกลบินบาร์ท มาทดสอบด้วยสถิติ paired-t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า p=0.6537, 0.5403, 0.1953, 0.9223 และ 0.6791 ตามลำดับ เมื่อนำมาทำการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างรวม 109 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันโดยค่า p=0.1718 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

การทดสอบหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของค่าร้อยละของฮีโมโกลบินทุกชนิดที่ได้จากการทดสอบน้ำเลือดที่จัดเตรียมทั้งสองวิธีพบว่ามีความสัมพันธ์กันดีมาก โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R=0.9896 และสมการถดถอยเชิงเส้น Y=0.9678X +0.1633 ดังแสดงในรูปที่ 2

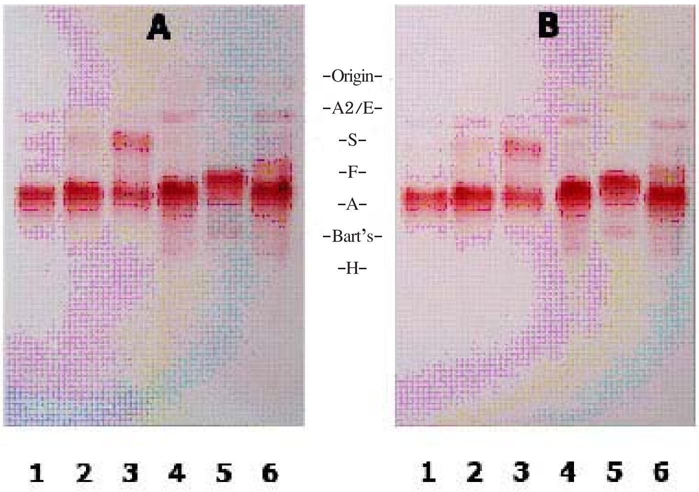
ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณร้อยละฮีโมโกลบินที่ทดสอบจากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานกับวิธีเตรียมอย่างง่ายจากตัวอย่างทั้ง 109 ราย พบว่ามีค่าความแตกต่างเฉลี่ย ความสอดคล้องต่ำสุด และความสอดคล้องสูงสุด เท่ากับ -1.0 , -22.5 และ 24.6 ตามลำดับ ปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินที่ทดสอบจากน้ำเลือดที่เตรียมทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันถึง 108 ราย มีเพียง 1 รายที่ค่าที่ตรวจวัดได้ไม่สอดคล้องกัน ดังแสดงในรูปที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างแยกตามชนิดของฮีโมโกลบินที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าจากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีเตรียมอย่างง่าย และค่าความสอดคล้อง Kappa statistic agreement

		จำนวนตัวอย่างแยกตามชนิดของฮีโมโกลบินจากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐาน				
		AA_2	AE	HAA_2	Bart's AF	
จำนวนตัวอย่างแยกตามชนิดของฮีโมโกลบินจากน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่าย	AA_2	45	0	0	0	(41.3%)
	AE	0	23	0	0	(21.1%)
	HAA_2	0	0	21	0	(19.3%)
	Bart's AF	0	0	0	20	(18.3%)
		(41.3%)	(21.1%)	(19.3%)	(18.3%)	
	Kappa					1.0000
	Standard error					0.0000
	95% CI					1.000 to 1.000

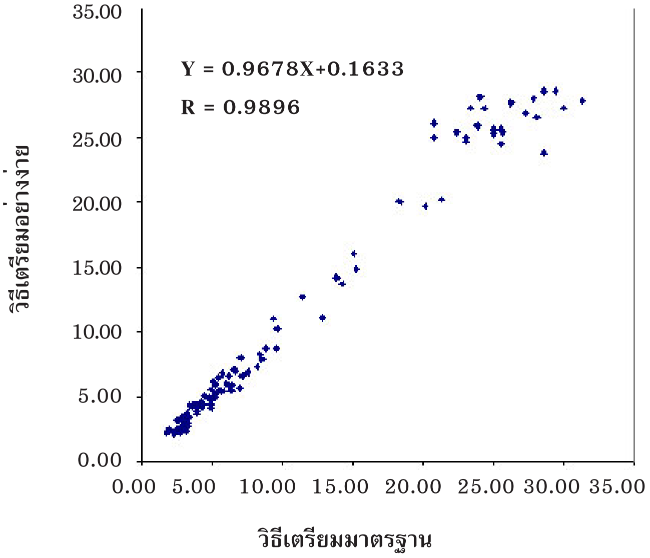
ตารางที่ 3 แสดงชนิดของฮีโมโกลบิน และปริมาณที่ตรวจวัดได้จากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐาน และวิธีเตรียมอย่างง่ายของกลุ่มตัวอย่าง 5 กลุ่ม

กลุ่มตัวอย่าง	ชนิดของ Hb	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณ Hb จากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐาน				ปริมาณ Hb จากน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่าย				ค่า P (α=0.05)
			ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
Normal	A_2	24	2.10	3.50	3.02	0.36	2.20	3.60	2.98	0.42	0.6537
β - thal trait	A_2	21	4.00	7.00	5.28	0.78	4.10	6.80	5.37	0.84	0.5403
Hb E trait	E	23	20.80	31.30	25.67	2.86	23.80	28.60	26.38	1.40	0.1953
Hb H disease	H	21	3.30	21.30	10.70	5.85	3.70	20.20	10.72	5.91	0.9223
Bart's AF	Bart's	20	1.90	11.50	6.09	2.40	2.30	12.70	6.15	2.52	0.6791
รวม		**109**	**1.90**	**31.30**	**10.28**	**8.91**	**2.20**	**28.60**	**10.45**	**9.11**	**0.1718**

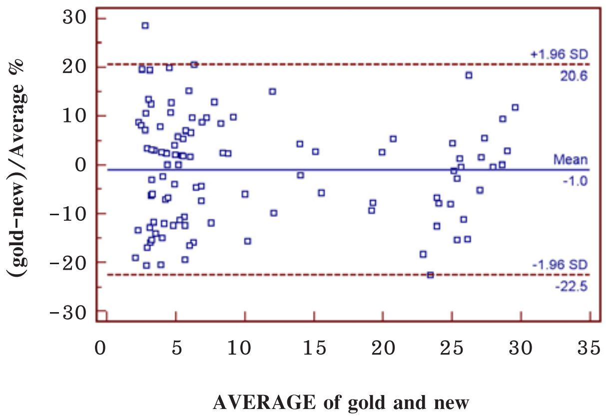


รูปที่ 1 แสดงการแยกแถบฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตทจากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐาน (A) เปรียบเทียบกับน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่าย (B)

หมายเลข 1 คือ คนปกติ, 2 คือ พาหะของบีตาธาลัสซีเมีย, 3 คือ พาหะของฮีโมโกลบินอี, 4 คือ โรคฮีโมโกลบินเอช, 5 คือ เด็กแรกคลอดที่มีฮีโมโกลบินบาร์ท และ 6 คือ ตัวอย่างควบคุมที่มีแถบฮีโมโกลบินชนิด $HASA_2$



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณร้อยละของแถบฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ที่ตรวจวัดจากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานเปรียบเทียบกับน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่าย



รูปที่ 3 Bland-Altman plot แสดงความแตกต่างระหว่างปริมาณร้อยละฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ที่ทดสอบจากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐาน (gold) กับน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่าย (new)

วิจารณ์

กลุ่มตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษาจำนวน 109 ราย ได้ผ่านการตรวจเบื้องต้นทางโลหิตวิทยาเพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยพาหะและโรคธาลัสซีเมีย ตามเกณฑ์มาตรฐานของ International Committee for Standardization in Hematology[11-12] ค่า MCV ที่ต่ำกว่า 80 fL เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการจำแนกพาหะธาลัสซีเมียออกจากกลุ่มคนปกติได้[5] ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มพาหะของบีตา-ธาลัสซีเมีย และพาหะของฮีโมโกลบินอี มีค่า MCV ต่ำกว่า 80 fL ทั้งสองกลุ่มสอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานที่กล่าวข้างต้น เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาทำการทดสอบประเมินคุณภาพของน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่ายพบว่า การแยกของแถบฮีโมโกลบินแต่ละชนิดในกระแสไฟฟ้าแยกได้ชัดเจน และตำแหน่งของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดตรงตามตำแหน่งของตัวอย่างควบคุมที่ทำควบคู่กัน และผู้ทำการทดสอบอ่านชนิดของแถบฮีโมโกลบินได้ผลตรงกันทุกรายโดยค่าความสอดคล้อง K=1.00 แม้แต่ฮีโมโกลบินบาร์ทในเด็กแรกคลอดที่ตรวจพบได้ในปริมาณต่ำ แต่มีความสำคัญในการวินิจฉัยพาหะอัลฟ่าธาลัสซีเมีย[6, 13-14] ก็สามารถตรวจพบได้ทั้ง 20 ราย แสดงให้เห็นว่าการเตรียมน้ำเลือดอย่างง่ายด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้มีความไว (sensitivity) สูง ใช้ในการทดสอบแยกชนิดของฮีโมโกลบินได้ไม่แตกต่างกับการเตรียมน้ำเลือดด้วยวิธีมาตรฐาน

เมื่อนำฮีโมโกลบินที่แยกได้จากน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่ายมาตรวจวัดค่าเฉลี่ยของปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบิน แล้วนำมาเปรียบเทียบกับน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐาน โดยใช้สถิติ paired-t test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีความสัมพันธ์กันดีมาก โดยค่า R=0.988791 โดยเฉพาะกลุ่มพาหะบีตาธาลัสซีเมียที่เกณฑ์การวินิจฉัย[7, 15-16] ต้องดูค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงร่วมกับปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบิน A_2 ที่มากกว่าร้อยละ 3.5 พบว่าสามารถวินิจฉัยได้ถูกต้องทุกรายเมื่อทำการทดสอบจากน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่าย แสดงว่าน้ำเลือดที่เตรียมอย่างง่ายนี้สามารถใช้ทดแทนน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณร้อยละของฮีโมโกลบินทุกรายที่ได้จากการทดสอบสองวิธีจากตัวอย่าง 109 ราย และแสดงภาพด้วย Bland-Altman plot (รูปที่ 3) พบว่ามี 1 ราย ที่ค่าที่ตรวจวัดได้ไม่สอดคล้องกัน ซึ่งเป็นตัวอย่างในกลุ่มคนปกติที่ทดสอบปริมาณฮีโมโกลบินเอสองจากน้ำเลือดที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีเตรียมอย่างง่ายได้ค่าร้อยละ 3.2 และ 2.4 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่าทั้งสองยังคงอยู่ในช่วงค่าของคนปกติ คือ ร้อยละ 2.0-3.5 จึงไม่มีผลกระทบต่อการวินิจฉัยโรคหรือพาหะของธาลัสซีเมีย

การเตรียมน้ำเลือดด้วยวิธีมาตรฐาน มีขั้นตอนที่ต้องใส่น้ำกลั่นลงไปเพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเนื่องจากภาวะ hypotonic เม็ดเลือดแดงที่แตกด้วยวิธีนี้จะมีเศษของผนังเม็ดเลือดแดงหลงเหลืออยู่จึงต้องกำจัดออกโดยใช้สารโทลูอีนเป็นตัวสกัด[4] แต่การเตรียมน้ำเลือดอย่างง่ายนี้ ผู้วิจัยได้เติมสาร saponin ลงในส่วนผสมของน้ำยา สาร saponin มีคุณสมบัติเป็น detergent ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้หมดและไม่เหลือเศษของเม็ดเลือดแดงอยู่ ทำให้ไม่ต้องสกัดด้วยโทลูอีน อีกทั้งยังลดเวลาการผสมเลือดกับน้ำยาเหลือเพียง 1 นาทีก็สามารถนำน้ำเลือดไปใช้งานได้ ช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานเลี่ยงการสัมผัสสารโทลูอีนที่มีผลเสียต่อสุขภาพ นอกจากนี้การลดขั้นตอนการสกัดด้วยสารโทลูอีนและการกำจัดตะกอนด้วยการดูดทิ้งไปทางท่อระบายน้ำยังช่วยลดการปนเปื้อนในสภาวะแวดล้อมได้

การทดสอบชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้ายังคงได้รับการแนะนำให้ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน[5, 17] จากข้อมูลการใช้งานของหน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา ตั้งแต่ พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2549 หลังจากนำเครื่องอัตโนมัติที่อาศัยหลักการโครมาโตกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) รุ่น VARIANT II (Biorad) มาใช้งาน พบว่า ยังคงต้องทำการทดสอบแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินเอช และฮีโมโกลบินบาร์ท เฉลี่ยถึงร้อยละ 9.15 ของปริมาณงานทั้งหมด ดังนั้นการเตรียมน้ำเลือดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีประโยชน์อย่างมาก เพราะช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานเลี่ยงการสัมผัสสารโทลูอีนที่มีอันตรายต่อสุขภาพได้

สรุป

ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า สามารถใช้น้ำเลือดที่จัดเตรียมอย่างง่ายทดแทนวิธีเตรียมมาตรฐานในการทดสอบหาชนิดปริมาณร้อยละฮีโมโกลบินต่าง ๆ ด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าได้โดยไม่มีผลกระทบต่อการวินิจฉัยพาหะและโรคธาลัสซีเมีย วิธีเตรียมน้ำเลือดอย่างง่ายนี้มีข้อดีคือ เตรียมได้ง่าย หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ลดเวลาและขั้นตอนในการจัดเตรียม โดยที่ผลการทดสอบไม่แตกต่างไปจากเดิม

เอกสารอ้างอิง

1. ธาลัสซีเมีย. ใน: บุญเชียร ปานเสถียรกุล, บรรณาธิการ. สถานการณ์ปัจจุบันและกลวิธีในการป้องกันและควบคุมโรคเลือดในประเทศไทย (รายงานทางวิชาการ, คณะอนุกรรมการประเมินสถานการณ์โรคธาลัสซีเมีย). กรุงเทพฯ: นำอักษรการพิมพ์; 2533.
2. สุทัศน์ ฟู่เจริญ, ปราณี วินิจจะกูล. Thalassemia and hemoglobinopathy. ใน: ถนอมศรี ศรีชัยกุล, แสงสุรีย์ จูฑา, บรรณาธิการ. ตำราโลหิตวิทยา การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ที.พี.พรินท์ จำกัด; 2537;202-41.
3. Panich V, Pornpatkul M, Sriroongrueng W. The problem of thalassemia in Thailand. Southest Asian J Trop Med Public Health 1992;23 Suppl 2:S1-6
4. Wasi P. Basic laboratory for thalassemia and abnormal hemoglobin. Bangkok: Division of Hematology, Department of Medicine, Mahidol University, Thailand; 1985.
5. Clarke MG, Higgins NT. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. Clin Chem 2000;46(8B):1284-90
6. Hall FW, Lundgrin DB. Screening for alpha- thalassemia in neonates. Routine erythrocyte measurements [abstract]. Am J Clin Pathol 1987;87:389-91.
7. 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. Southest Asian J Trop Med Public Health 1991;22:16-29.
8. Variant hemoglobin testing system, The Operation Manual. California: Bio-Rad Laboratiories; 1996.
9. สมาคมชีวอนามัยและความปลอดภัยในการทำงาน. มาตรฐานสารเคมีในอากาศและดัชนีวัดทางชีวภาพกรุงเทพ. กรุงเทพฯ: นำอักษรการพิมพ์; 2543;56
10. ADVIA 120: the operation manuals. New York: Bayer; 2000.
11. International committee for standardization in haematology ICSH espert panel on abnormal haemoglobins. Recommendations for neonatal screening of haemoglobinopathies. Clin Lab Haematol 1988;10:335-45.
12. British committee for standards in haematology. Guidelines for haemoglobinopathy screening. Clin Lab Haematol 1988;10:87-94.
13. Rugless MJ, Fisher CA, Stephens AD, Amos RJ, Mohammed T, old JM. Hb Bart's in cord blood: an accurate indicater of alpha thalassemia [abstract]. Hemoglobin 2006;30:57-62.
14. Sriroongrueng W, Pornpatkul M, panich V, Fucharoen S. Alpha- thalassemia incidence in southern Thailand by restriction endonuclease analysis of globin DNA form placental blood at Songklanagarind Hospital. Southest Asian J Trop Med Health 1997;28 Suppl 3:S93-6.
15. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 1987;11:65-88.
16. Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkkij 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.
17. Desai S, Colah R, Gupte S, Mohanty D. Is cellulose acetate electrophoresis a suitable technique for detection of Hb Bart's at birth? Hum Hered 1997;47:181-4.