อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจกรองพาหะเบต้าธาลัสซีเมียด้วย microcolumn chromatography อย่างง่าย 2 ชนิด โดยการวัดปริมาณ hemoglobin A2

The comparative study between two simple microcolumn chromatography for diagnosis of beta thalassmia carrier determined by hemoglobin A2 level

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 12 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 1679034
เลขเรียกหนังสือ จ RC
WA
.7 .A6
ว58ร
2556

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ พีระพล วอง

แพทย์หญิง สุชิลา ศรีทิพยวรรณ

นายแพทย์ เอกอมร เทพพรหม

นายแพทย์ รวิสุต เดียวอิศเรศ

ศาสตราจารย์เกียรติคุณนายแพทย์ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี

ธันวาคม 2556

สัญญาเลขที่ R2556C020

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจกรองพาหะเบต้าธาลัสซีเมียด้วย microcolumn chromatography อย่างง่าย 2 ชนิด โดยการวัดปริมาณ hemoglobin A2

The comparative study between two simple microcolumn chromatography for diagnosis of beta thalassmia carrier determined by hemoglobin A2 level

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ พีระพล วอง
แพทย์หญิง สุชิลา ศรีทิพยวรรณ
นายแพทย์ เอกอมร เทพพรหม
นายแพทย์ รวิสุต เดียวอิศเรศ
ศาสตราจารย์เกียรติคุณนายแพทย์ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี
คณะแพทยศาสตร์

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญเรื่อง	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	จ
บทคัดย่อภาษาไทย	ฉ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
บทนำ	1
เนื้อเรื่อง	4
ผลการวิจัย	8
ข้อวิจารณ์	12
สรุปและข้อเสนอแนะ	13
บรรณานุกรม	14
Output ที่ได้จากโครงการ	15

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่าร้อยละของ Hb A2 / Hb E โดยวิธี DEAE sephadex microcolumn chromatography โดยทำการตรวจ 3 ครั้ง ใช้ microcolumn ใหม่ทั้ง 3 ครั้ง 6

ตารางที่ 2 ค่าร้อยละของ Hb A2 / Hb E โดยวิธี Q sepharose microcolumn chromatography โดยทำการตรวจ 3 ครั้ง ใช้ microcolumn ซ้ำ 3 ครั้ง 6

ตารางที่ 3 สัดส่วนของ Hb A, Hb A2 และ abnormal Hb จาก HPLC ในตัวอย่างเลือดที่คัดออก 8

ตารางที่ 4 สัดส่วนของ Hb A2 ที่ได้จากการตรวจทั้งสามวิธี 8

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยสัดส่วน Hb A2 ในกลุ่มตัวอย่างปกติ และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจากการตรวจด้วย Q sepharose และ DEAE sephadex microcolumn chromatography เทียบกับ HPLC 9

ตารางที่ 6 ตาราง 2x2 แสดงค่า sensitivity และ specificity ของ Q sepharose microcolumn chromatography ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียโดยใช้ HPLC เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัย 10

ตารางที่ 7 ตาราง 2x2 แสดงค่า sensitivity และ specificity ของ DEAE sephadex microcolumn chromatography ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียโดยใช้ HPLC เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัย 11

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยสัดส่วนของ Hb A2 จากการตรวจวัดในตัวอย่างเลือดปกติ 1 รายซ้ำ 10 ครั้ง และค่า CV 11

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยสัดส่วนของ Hb A2 จากการตรวจวัดในพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 1 รายซ้ำ 10 ครั้ง และค่า CV 11

สารบัญแผนภูมิ

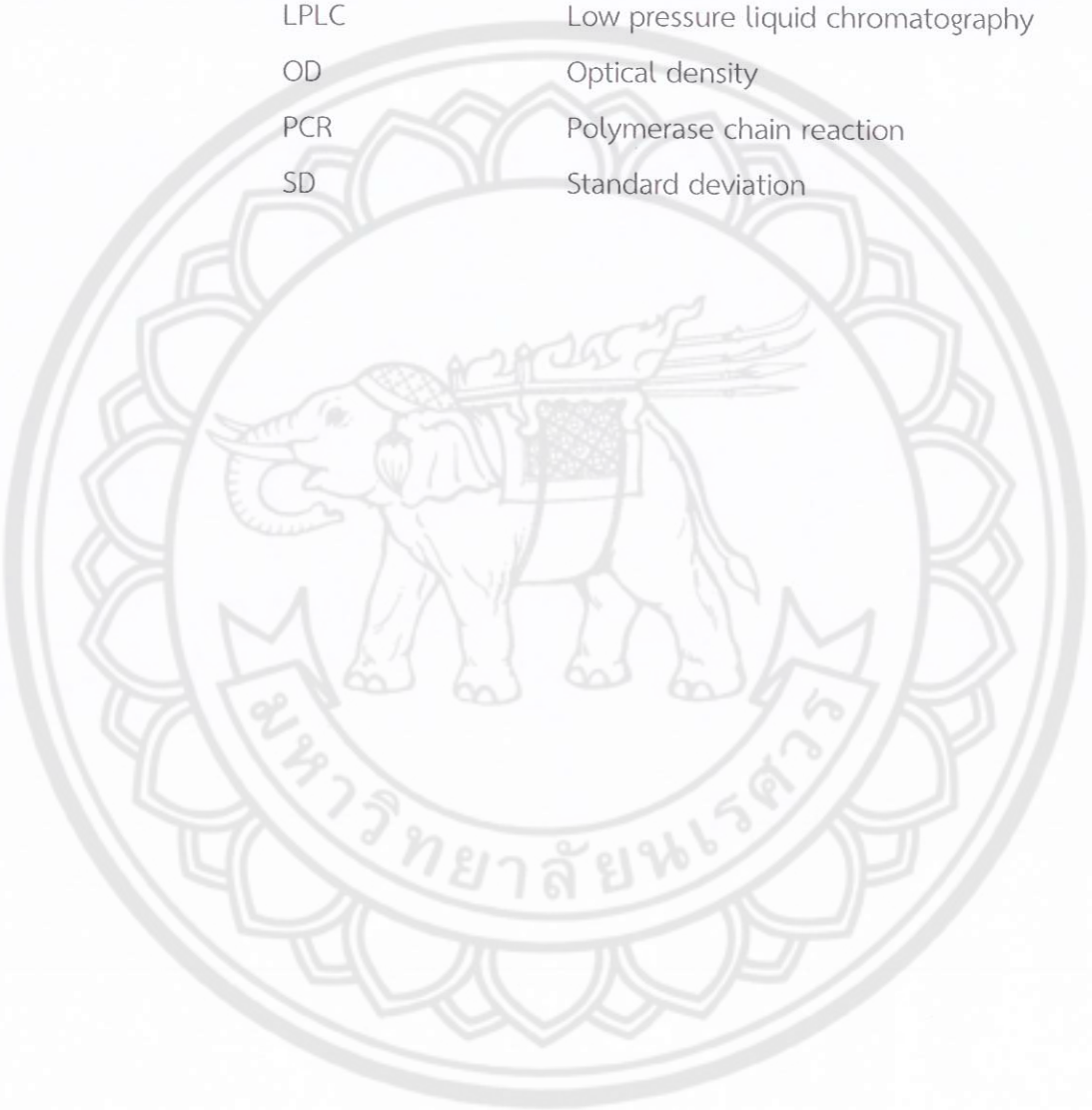
หน้า

แผนภูมิที่ 1 scatterogram ของค่า Hb A2 ที่ได้ระหว่าง Q sepharose microcolumn chromatography กับ HPLC (n = 347) 9

แผนภูมิที่ 2 scatterogram ของค่า Hb A2 ที่ได้ระหว่าง DEAE sephadex microcolumn chromatography กับ HPLC (n = 347) 10

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ARMS	Amplification refractory mutation system
DEAE	Diethyl aminoethyl
Hb	Hemoglobin
HPLC	High performance liquid chromatography
LPLC	Low pressure liquid chromatography
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
SD	Standard deviation



บทคัดย่อมหาวิทยาลัยนเรศวร

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจกรองพาหะเบต้าธาลัสซีเมียด้วย microcolumn chromatography อย่างง่าย 2 ชนิด โดยการวัดปริมาณ hemoglobin A2

(ภาษาอังกฤษ) The comparative study between two simple microcolumn chromatography for diagnosis of beta thalassmia carrier determined by hemoglobin A2 level

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ พีระพล วอง (45%)

หน่วยงานที่สังกัด หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์

โทรศัพท์ 055-965058 โทรสาร 055-227137

ผู้ร่วมวิจัย

แพทย์หญิง สุชิลา ศรีทิพยวรรณ (25%)

หน่วยงานที่สังกัดภาควิชาสูติศาสตร์ นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์

โทรศัพท์ 055-965509

ผู้ร่วมวิจัย

นายแพทย์ เอกอมร เทพพรหม (15%)

หน่วยงานที่สังกัด หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์

โทรศัพท์ 055-965058

ผู้ร่วมวิจัย

นายแพทย์ รวิสุต เดียวอิศเรศ (15%)

หน่วยงานที่สังกัด หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์

โทรศัพท์ 055-965058

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ศาสตราจารย์เกียรติคุณนายแพทย์ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี (0%)

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

งบประมาณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวนเงิน 148,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2556

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

จุดประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบความแม่นยำ ความเที่ยง และความสามารถในการทำซ้ำได้ ของวิธีตรวจวัดสัดส่วนของ hemoglobin (Hb) A2 ด้วย microcolumn chromatography โดยใช้ Q Sepharose ซึ่งเป็น anion exchanger ตัวใหม่ และ Diethylaminoethyl (DEAE) Sephadex ซึ่งใช้อยู่ในปัจจุบัน กับวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) **วิธีวิจัย** รวบรวมตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการศึกษาทั้งสิ้น 350 ราย ในจำนวนนี้ 50 รายได้รับการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียโดยยืนยันด้วยการตรวจทางอณูชีววิทยา นำตัวอย่างทั้ง 350 รายมาตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 โดยใช้ microcolumn chromatography ทั้งสองวิธี และ HPLC **ผลการวิจัย** คัดตัวอย่างเลือดที่มี abnormal Hb 3 ราย ออกจากการศึกษา ค่าเฉลี่ยสัดส่วนของ Hb A2 ในตัวอย่างเลือดปกติ และพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่ได้จากการตรวจวัดโดยใช้ microcolumn chromatography ทั้งสองวิธี และ HPLC ได้ผลดังนี้ Q Sepharose microcolumn chromatography: ร้อยละ 2.70±0.40 (ค่าเฉลี่ย±SD) และ 6.16±1.21 ตามลำดับ DEAE Sephadex microcolumn chromatography: ร้อยละ 2.77±0.38 และ 5.55±1.12 ตามลำดับ และ HPLC: ร้อยละ 2.65±0.31% และ 5.40±0.92% ตามลำดับ ค่า sensitivity ค่า specificity ค่า positive และ negative predictive value ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจากการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ด้วย Q Sepharose และ DEAE Sephadex microcolumn chromatography โดยใช้ HPLC เป็นการวินิจฉัยมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 100 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ระหว่าง Q Sepharose microcolumn chromatography และ HPLC เท่ากับ 0.986 ($p<0.001$) และระหว่าง DEAE Sephadex microcolumn chromatography และ HPLC เท่ากับ 0.988 ($p<0.001$) **สรุป** ข้อมูลสัดส่วนของ Hb A2 ที่ได้จากการตรวจวัดด้วย microcolumn chromatography ทั้งสองวิธีมีความน่าเชื่อถือ สามารถทำซ้ำได้ เหมาะกับการใช้งานในประชากร Q Sepharose microcolumn chromatography เป็นวิธีการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ที่เป็นทางเลือกที่ดี หากคำนึงถึงความสามารถในการนำ column มาใช้ใหม่ได้เพื่อความประหยัด และความสะดวกของผู้ตรวจวัด

Abstract

Objectives: Quantitation of hemoglobin (Hb) A2 with microcolumn chromatography on a new anion exchanger, Q Sepharose, and a currently in use, Diethylaminoethyl (DEAE) Sephadex were compared with high performance liquid chromatography (HPLC) to ascertain their relative accuracy, precision and reproducibility. **Methods**: Three hundred and fifty blood specimens, including 50 samples with genetically proven beta-thalassemia heterozygote were examined with two microcolumn chromatography methods and HPCL. **Results**: Three blood samples with abnormal Hb were excluded from the study. The mean (± SD) Hb A2 proportion in normal and beta-thalassemia heterozygotes were: 2.70±0.40%

and 6.16±1.21%, respectively, determined by Q Sepharose microcolumn chromatography; 2.77±0.38% and 5.55±1.12%, respectively, determined by DEAE Sephadex microcolumn chromatography; and 2.65±0.31% and 5.40±0.92%, respectively, determined by HPLC. The diagnostic accuracy of Q Sepharose and DEAE Sephadex microcolumn chromatography were 100% for sensitivity, specificity, positive and negative predictive values. Correlation coefficient value (r^2) of Q Sepharose microcolumn chromatography and HPLC was 0.986 ($p<0.001$), DEAE Sephadex microcolumn chromatography and HPLC was 0.988 ($p<0.001$). Conclusions: Both microcolumn chromatography methods were found to be reliable, reproducible and well suited for large scale surveys. Nevertheless, with reusable property and convenience, Q Sepharose microcolumn chromatography may be an alternative mean for Hb A2 determination in the population.

บทนำ

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียจัดเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เป็นปัญหาสำหรับประเทศไทย ผู้ป่วยที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจะมีปัญหาโลหิตจางเรื้อรังและรุนแรง บางชนิดจะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา ผู้ป่วยเหล่านี้จำเป็นต้องได้รับเลือดเป็นประจำ ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการได้รับเลือด ผู้ป่วยมีอายุขัยสั้น มีรูปร่างหน้าตาผิดปกติ สร้างความทุกข์ทรมานให้แก่ตนเอง และเป็นภาระของประเทศ การตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียในหญิงตั้งครรภ์และสามี การกำหนดคู่เสี่ยงที่มีโอกาสได้บุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด และการพิจารณายุติการตั้งครรภ์ในรายที่พบว่าบุตรในครรภ์เป็นโรค เป็นระบบการควบคุมโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของประเทศที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน

เบต้าธาลัสซีเมียเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่เป็นปัญหาหลักของประเทศ พบชนิดของ mutation ในประเทศไทยมากกว่า 30 ชนิด[1] การวินิจฉัยโดยใช้การตรวจ DNA เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนี้ยังทำได้เฉพาะห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมบางแห่งเท่านั้น ดังนั้นในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียในระบบการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของประเทศจึงใช้วิธีวัดสัดส่วนของ hemoglobin (Hb) A2 เป็นหลัก โดย Hb A2 ในคนปกติมีสัดส่วนประมาณ 2.5-3.5%[2] สัดส่วนดังกล่าวจะสูงขึ้นในพาหะของเบต้าธาลัสซีเมีย วิธีมาตรฐานในการวัดสัดส่วนของ Hb A2 ทำได้หลายวิธี ได้แก่ high performance liquid chromatography (HPLC), low pressure liquid chromatography (LPLC), DEAE sephadex A50 microcolumn chromatography เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 (A2 test) ที่ง่าย ทำได้รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำ และราคาถูก เพื่อใช้ในงานบริการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของประเทศ ซึ่งต้องทำการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยพาหะธาลัสซีเมียในประชากรจำนวนมาก วิธี A2 test ในการศึกษานี้เป็น microcolumn chromatography อย่างง่าย โดยแบ่งเป็นอีก 2 วิธี ตามชนิดของวัสดุที่ใช้ทำ column chromatography ได้แก่ DEAE sephadex A50 และ Q sepharose วิธี A2 test อย่างง่ายที่ใช้ DEAE sephadex A50 พัฒนามาจากวิธี DEAE sephadex A50 microcolumn chromatography มาตรฐาน แต่ใช้ disposable syringe ขนาด 3.5 มิลลิลิตรเป็น column และ disposable syringe ขนาด 10 มิลลิลิตรเป็น reservoir[1] ซึ่งหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้ใช้วิธีดังกล่าวในงานบริการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในเขตภาคเหนือตอนล่าง มานานกว่า 10 ปีแล้ว ผลที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำ และราคาถูก เหมาะกับการใช้คัดกรองและวินิจฉัยในประชากรจำนวนมาก สำหรับ Q sepharose[3] เป็นวัสดุที่เริ่มมีการนำมาใช้ในระยะหลัง มีคุณสมบัติเป็น anion exchanger ที่แรงกว่า DEAE sephadex A50 ดังนั้นการจับและปล่อย Hb A2 จึงทำได้ดี ไม่ต้องใช้การปรับ pH ที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรวจเหมือนกับการใช้ DEAE sephadex A50 จึงทำได้ง่ายกว่า ขณะที่ยังให้ผลการตรวจที่แม่นยำ นอกจากนี้หลังจากผ่านการล้าง hemolysate ออกแล้ว ยังสามารถใช้ตรวจซ้ำได้อีกหลายครั้ง ดังนั้นจึงมีโอกาสนำมาใช้แทน DEAE sephadex A50 ที่ใช้อยู่

การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการเปรียบเทียบผล Hb A2 ที่ได้จาก A2 test ทั้งสองวิธีดังกล่าว เทียบกับ HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อนำข้อมูลมาพิจารณาปรับเปลี่ยนวิธีการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ในงานบริการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เปรียบเทียบผล Hb A2 ที่ได้จาก A2 test ทั้งสองวิธี เทียบกับ HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อพิจารณาปรับเปลี่ยนวิธีการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ในงานบริการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ขอบเขตการวิจัย

DEAE sephadex A50 เป็น anion exchanger ที่ดีสำหรับแยก Hb A2 ออกจาก Hb อื่น ๆ อย่างไรก็ดีการแยก Hb A2 ดังกล่าวต้องใช้สารละลายที่มี pH ที่เฉพาะเจาะจงค่าหนึ่งในการชะเอา Hb A2 ออกจาก column ในทางปฏิบัติ DEAE sephadex A50 จะถูกบรรจุใน microcolumn ซึ่งถูกปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วยสารละลาย 0.05 M TRIS-HCL-0.01% KCN buffer หลังจากปล่อยให้ Hb เข้าไปจับกับตัว DEAE sephadex A50 ใน column เรียบร้อยแล้ว จะใช้สารละลาย 0.05 M TRIS-HCL-0.01% KCN buffer ซึ่งมี pH 8.2 ในการชะเอา Hb A2 ออกจาก column[1] ความคลาดเคลื่อนในการปรับ pH ของสารละลายมีผลกับปริมาณ Hb A2 ที่จะหลุดออกมา ต่างจาก Q sepharose ซึ่งเป็น anion exchanger ที่แรงกว่า มี pH working range ที่กว้างมาก[3] ในทางปฏิบัติหลังจากเตรียม working buffer ที่ใช้ในการชะเอา Hb A2 ออกจาก columnใน pH ที่เหมาะสมแล้ว การตรวจครั้งต่อ ๆ ไปแทบไม่ต้องคำนึงถึง pH ของ working buffer อีกเลย ดังนั้นจึงเตรียมสารละลายได้ง่ายกว่า ไม่ต้องใช้ pH meter ในการปรับ pH ของ working buffer ทุกครั้ง และลดความคลาดเคลื่อนของปริมาณ Hb A2 ที่หลุดออกมาใน eluate นอกจากนี้ Q sepharose ยังใช้ตรวจซ้ำได้หลายครั้ง ภายหลังจากทำการล้าง microcolumn ด้วยสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว จึงน่าจะทำให้ต้นทุนการตรวจลดลงได้อีก การศึกษาครั้งนี้คาดว่าค่าสัดส่วน Hb A2 ที่ได้จากการตรวจ A2 test ทั้งสองวิธีจะได้ใกล้เคียงกัน และสอดคล้องกับการตรวจ HPLC ซึ่งทำให้ A2 test ที่ใช้ Q sepharose เป็นการตรวจที่น่าสนใจ เนื่องจากทำได้ง่าย และราคาถูก

การเปรียบเทียบผล Hb A2 ที่ได้จาก A2 test และ HPLC ในกลุ่มพาหะของเบต้าธาลัสซีเมีย ในการศึกษานี้ ตัวอย่างเลือดที่นำมาทดสอบจะได้รับการตรวจวิเคราะห์ระดับยีนเพื่อยืนยันการวินิจฉัยพาหะของเบต้าธาลัสซีเมีย ซึ่งทำโดยวิธี multiplex amplification refractory mutation system (multiplex ARMS) การตรวจดังกล่าวครอบคลุมชนิดของ mutation 6 ชนิดที่พบบ่อยในเบต้าธาลัสซีเมียในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง ได้แก่ codon 26 (G-A), codon 41/42 (-TTCT), codon 17 (A-T), IVS-I nt1 (G-T), IVS-I nt5 (G-C), codon 71/72 (+A) ซึ่งสามารถวินิจฉัยเบต้าธาลัสซีเมียส่วนใหญ่ได้ 86-92%[4, 5] ไม่สามารถตรวจยืนยันด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อครอบคลุมชนิดของ mutation ทั้งหมดในเบต้าธาลัสซีเมีย

เนื่องจากต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง ตัวอย่างเลือดที่ไม่พบ mutation ในกลุ่มนี้จะถูกตัดออกจากการศึกษา

ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework) ของการวิจัย

DEAE sephadex column chromatography (macrocolumn) เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวัด Hb A2 เพื่อวินิจฉัยพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียมานานแล้ว ต่อมามีการพัฒนาการใช้ DEAE sephadex microcolumn ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำเช่นเดียวกัน แต่ทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่า ราคาถูกกว่า เข้ามาแทนที่[6, 7] และภายหลังจึงมีการปรับปรุงวัสดุที่ใช้เป็น column และ reservoir ในการตรวจเป็นวัสดุที่หาง่าย ราคาถูก ใช้ชื่อว่า A2 test อย่างง่าย[1] ซึ่งหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้ใช้วิธีดังกล่าวในงานบริการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในเขตภาคเหนือตอนล่าง มานานกว่า 10 ปีแล้ว ผลที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำ และราคาถูก เหมาะกับการใช้คัดกรองและวินิจฉัยในประชากรจำนวนมาก

ปัจจุบันมีการพัฒนาการใช้เทคนิค microcolumn chromatography ในงานตรวจคัดกรองและวินิจฉัยพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียโดยใช้วัสดุอื่นนอกเหนือจาก DEAE sephadex เช่น รายงานการใช้ DEAE sepharose microcolumn chromatography ในการตรวจคัดกรอง Hb E[8] และตรวจวินิจฉัยพาหะของเบต้าธาลัสซีเมีย[9] สำหรับ Q sepharose เป็น anion exchanger ที่แรงกว่า DEAE sephadex มี pH working range ที่กว้างกว่า[3] จึงน่าจะลดความคลาดเคลื่อนในการตรวจวัดปริมาณ Hb A2 ได้ดีกว่า ขั้นตอนการเตรียมสารละลายทำได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ยังสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกหลายครั้ง อย่างไรก็ดี ยังไม่มีรายงานการใช้ Q sepharose ด้วยเทคนิค microcolumn chromatography เพื่อตรวจวินิจฉัยพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียเลย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- จัดทำข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบผล Hb A2 ที่ได้จาก A2 test ทั้งสองวิธี เทียบกับ HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อพิจารณาปรับเปลี่ยนวิธีการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ในงานบริการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
- นำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

เนื้อเรื่อง

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและตัวอย่าง

ประชากรเป้าหมายคือ

- หญิงตั้งครรภ์และสามีที่มาฝากครรภ์ ณ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 300 ราย (กลุ่มประชากรทั่วไป) ซึ่งหญิงตั้งครรภ์และสามีดังกล่าวจะต้องได้รับการตรวจคัดกรองและกำหนดคู่เสี่ยงของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียอยู่แล้ว ตามสิทธิประโยชน์ขั้นพื้นฐานในระบบหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ
- ผู้ป่วยทั่วไปของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรที่ได้รับการส่งตรวจ Hb typing หรือหญิงตั้งครรภ์และสามีที่ฝากครรภ์ในโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่าง และได้รับการส่งตัวอย่างเลือดมาตรวจวินิจฉัยและกำหนดคู่เสี่ยง ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร และผลการวินิจฉัยเป็นพาหะของเบต้าธาลัสซีเมีย จำนวน 60 ราย (กลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย)

เกณฑ์ในการคัดออก คือ ตัวอย่างในกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจากการตรวจด้วย HPLC แต่การยืนยันด้วย multiplex ARMS ซึ่งครอบคลุมชนิดของ mutation 6 ชนิดที่พบบ่อยในเบต้าธาลัสซีเมียในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง ไม่พบ mutation

จำนวนประชากรที่นำมาศึกษาทั้งสิ้น 360 ราย มาจากการศึกษาที่ใช้กระบวนวิธีวิจัยที่คล้ายคลึงกับการศึกษาครั้งนี้ 2 การศึกษา ซึ่งใช้ตัวอย่าง 220 - 300 ราย[1, 9]

การสังเกตและการวัด

แบ่งการศึกษาเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มประชากรทั่วไป และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย

กลุ่มประชากรทั่วไป ได้แก่หญิงตั้งครรภ์และสามีที่มาฝากครรภ์ ณ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 300 ราย เจาะเก็บเลือด 2-3 มิลลิลิตร ในหลอดที่มี EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยเก็บเลือดพร้อมกับการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ตามที่แพทย์สั่ง เลือดที่ได้จะถูกนำส่งหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในเวลาราชการ โดยทุกตัวอย่างจะทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังต่อไปนี้

HPLC

A2 test – DEAE sephadex microcolumn chromatography

A2 test – Q sepharose microcolumn chromatography

กลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย ได้แก่ผู้ป่วยทั่วไปของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร หรือหญิงตั้งครรภ์และสามีที่ฝากครรภ์ในโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่าง และได้รับการส่งตัวอย่างเลือดมาตรวจวินิจฉัย Hb typing ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร และผลการวินิจฉัยเป็นพาหะ

ของเบต้าธาลัสซีเมีย จำนวน 60 ราย การวินิจฉัยเบื้องต้นของพาหะเบต้าธาลัสซีเมียทำโดยวิธี HPLC ซึ่งได้สัดส่วนของ Hb A2 มากกว่า 4.0% หลังจากนั้นทำการตรวจยืนยันด้วย multiplex ARMS (beta mutation) เพื่อหา beta mutation (ตัวอย่างที่ไม่พบ beta mutation จะถูกคัดออก) โดยทุกตัวอย่างจะทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังต่อไปนี้

HPLC

A2 test – DEAE sephadex microcolumn chromatography

A2 test – Q sepharose microcolumn chromatography

multiplex ARMS (beta mutation)

คาดว่าจะมีตัวอย่างเลือดที่ถูกคัดออกเนื่องจากไม่พบ mutation จาก multiplex ARM ประมาณไม่เกิน 10 ราย คงเหลือตัวอย่างในกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมียทั้งสิ้น 50 ราย

วิธีการตรวจ DEAE sephadex microcolumn chromatography

- เตรียม hemolysate โดยใช้เลือด 40 µl ใส่ใน working buffer (0.05 M Tris-HCl-KCN pH 8.5) 2 ml
- ใส่ hemolysate ที่เตรียมไว้ 1 ml ผ่าน microcolumn จนแห้ง แล้วใส่ working buffer อีก 6 ml รอจนแห้งเช่นกัน
- ใส่ eluting buffer (0.05 M Tris-HCl-KCN pH 8.2) 20 ml เก็บ eluate ทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm เป็น OD1
- นำ hemolysate ที่เหลืออีก 100 µl รวมกับ working buffer 4,900 µl (ปริมาตรรวม 5,000 µl) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นค่าอ้างอิง OD2
- คำนวณปริมาณของ Hb A2 ตามสูตร

  Percent Hb A2 = OD1x40/OD2

วิธีการตรวจ Q sepharose microcolumn chromatography

- เตรียม hemolysate โดยใช้เลือด 20 µl ใส่ใน working buffer (0.05 M Tris-HCl-KCN pH8.5) 2 ml
- ใส่ hemolysate ที่เตรียมไว้ 1 ml ผ่าน microcolumn จนแห้ง แล้วใส่ working buffer อีก 2 ml รอจนแห้งเช่นกัน
- ใส่ eluting buffer (0.05 M Tris-HCl-KCN-12 mM NaCl pH8.5) 4 ml เก็บ eluate ทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm เป็น OD1
- นำ hemolysate ที่เหลืออีก 1 ml รวมกับ working buffer 3 ml (ปริมาตรรวม 4 ml) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นค่าอ้างอิง OD2

- คำนวณปริมาณของ Hb A2 ตามสูตร

  Percent Hb A2 = OD1x100/OD2

การตรวจ A2 test ด้วยวิธี DEAE sephadex microcolumn chromatography และ Q sepharose microcolumn chromatography จะทำโดยผู้วิจัยคนเดียวกัน ซึ่งมีประสบการณ์ในการทำ microcolumn chromatography มาก่อนแล้ว หลังได้รับตัวอย่างเลือดจะเริ่มดำเนินการตรวจในแต่ละวิธีในวันเดียวกัน มีการบันทึกเวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการตรวจในแต่ละวิธีทุกครั้งที่ทำการตรวจ

การตรวจ A2 test ด้วย Q sepharose microcolumn chromatography จะนำmicrocolumn มาใช้ซ้ำในการตรวจรวม 3 ครั้ง เพื่อความคุ้มค่า โดยการทดลองเบื้องต้นของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ในการนำ Q sepharose microcolumn มาใช้ตรวจวัดปริมาณ Hb A2 / Hb E ในตัวอย่างเลือด 5 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นพาหะและโรคธาลัสซีเมีย 5 ชนิด นำมาใช้ซ้ำ 3 ครั้ง เทียบกับการตรวจด้วย DEAE sephadex microcolumn chromatography (ใช้ครั้งเดียวทิ้ง) พบว่าค่า Hb A2 ที่ได้มีความสอดคล้องกันตามตารางที่ 1 และตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ค่าร้อยละของ Hb A2 / Hb E โดยวิธี DEAE sephadex microcolumn chromatography โดยทำการตรวจ 3 ครั้ง ใช้ microcolumn ใหม่ทั้ง 3 ครั้ง

ตัวอย่าง	ครั้งที่ 1 (%)	ครั้งที่ 2 (%)	ครั้งที่ 3 (%)
Normal	3.2	3.4	2.5
Heterozygous beta thalassemia	4.3	5.0	4.0
Heterozygous Hb E	22.9	23.4	22.4
Homozygous Hb E	62.3	69.2	84.8
Beta thalassemia / Hb E	49.0	44.3	41.4

ตารางที่ 2 ค่าร้อยละของ Hb A2 / Hb E โดยวิธี Q sepharose microcolumn chromatography โดยทำการตรวจ 3 ครั้ง ใช้ microcolumn ซ้ำ 3 ครั้ง

ตัวอย่าง	ครั้งที่ 1 (%)	ครั้งที่ 2 (%)	ครั้งที่ 3 (%)
Normal	3.3	2.6	2.9
Heterozygous beta thalassemia	6.1	4.3	5.4
Heterozygous Hb E	29.4	21.4	23.1
Homozygous Hb E	72.2	68.4	64.9
Beta thalassemia / Hb E	44.3	39.0	34.5

การรวบรวมข้อมูล

รวบรวมข้อมูลเป็น 2 กลุ่มแยกจากกัน ได้แก่ กลุ่มประชากรทั่วไป และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย

การวิเคราะห์ข้อมูล

กลุ่มประชากรทั่วไป

- นำข้อมูลการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย และการวินิจฉัยตัวอย่างปกติ ของการตรวจด้วย A2 test ทั้งสองวิธี มาจัดทำตาราง 2x2 เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการวินิจฉัยจาก HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อคำนวณ sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value และ accuracy ของการตรวจทั้งสองวิธี

กลุ่มประชากรทั่วไป รวมกับกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย

- นำข้อมูลสัดส่วนของ Hb A2 ที่ได้จากการตรวจทั้งสามวิธีนำมาหาค่า correlation coefficient (r^2) โดยข้อมูลที่ได้ยังสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ตามสัดส่วนของ Hb A2 ได้แก่กลุ่มตัวอย่างปกติ และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย ทำการหาค่าเฉลี่ย และพิสัยสัดส่วนของ Hb A2 ในตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม ในการตรวจทั้งสามวิธี

สถานที่เก็บข้อมูล

1. ห้องฝากครรภ์ ภาควิชาสูติศาสตร์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร
2. หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สถานที่ทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลการวิจัย

รวบรวมตัวอย่างเลือดจำนวนทั้งสิ้น 350 ราย แบ่งเป็นกลุ่มประชากรทั่วไป จำนวน 300 ราย และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่ผ่านการตรวจยืนยันด้วย multiplex ARMS (beta mutation) แล้ว จำนวน 50 ราย

คัดออกจากการวิจัย 3 ราย (0.85%) เนื่องจากตรวจพบ abnormal Hb จาก HPLC ได้แก่ Hb Tak 1 ราย Hb H Constant Spring 1 ราย และ unknown Hb 1 ราย ซึ่ง abnormal Hb เหล่านี้ทำให้สัดส่วนของ Hb A2 ที่ได้จาก Q sepharose และ DEAE sephadex microcolumn chromatography เบี่ยงเบนไป (ข้อมูลสัดส่วนของ abnormal Hb จาก HPLC แสดงในตารางที่ 3 ข้อมูลสัดส่วนของ Hb A2 ที่ได้จากการตรวจทั้งสามวิธีแสดงในตารางที่ 4) คงเหลือข้อมูลซึ่งนำมาประมวลผลได้ทั้งสิ้น 347 ราย

ตารางที่ 3 สัดส่วนของ Hb A, Hb A2 และ abnormal Hb จาก HPLC ในตัวอย่างเลือดที่คัดออก

	Hb A (%)	Hb A2 (%)	Abnormal Hb (%)
Hb Tak	50.3	2.3	39.2
Hb H Constant Spring	82.4	0.8	H - undetermined CS - 2.2
Unknown Hb	62.7	2.7	26.4

ตารางที่ 4 สัดส่วนของ Hb A2 ที่ได้จากการตรวจทั้งสามวิธี

	Q sepharose (%)	DEAE sephadex (%)	HPLC (%)
Hb Tak	2.9	5.3	2.3
Hb H Constant Spring	5.1	6.9	0.8
Unknown Hb	4.5	5.7	2.7

จากตัวอย่างเลือด 347 ราย มีกลุ่มประชากรปกติ 230 ราย และพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 59 ราย (ในจำนวนนี้ตัวอย่างเลือด 50 ราย ได้รับการตรวจยืนยันพาหะของเบต้าธาลัสซีเมียด้วย multiplex ARMS) ข้อมูลค่าเฉลี่ย (± SD) ของสัดส่วน Hb A2 ในกลุ่มตัวอย่างปกติ และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย จากการตรวจทั้งสามวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน ข้อมูลแสดงในตารางที่ 5

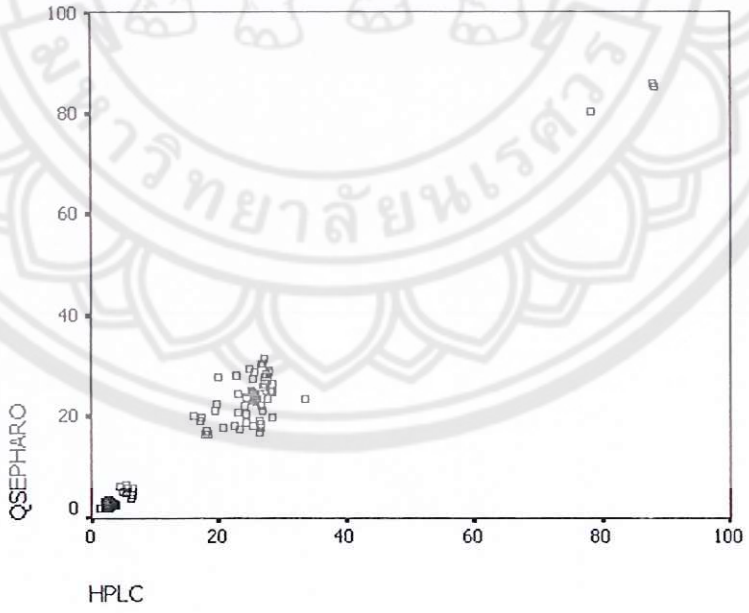
ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยสัดส่วน Hb A2 ในกลุ่มตัวอย่างปกติ และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย จากการตรวจด้วย Q sepharose และ DEAE sephadex microcolumn chromatography เทียบกับ HPLC

	กลุ่มตัวอย่างปกติ n = 230 (%)	กลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย n = 59 (%)
Q sepharose	2.70 ± 0.40	6.16 ± 1.21
DEAE sephadex	2.77 ± 0.38	5.55 ± 1.12
HPLC	2.65 ± 0.31	5.40 ± 0.92

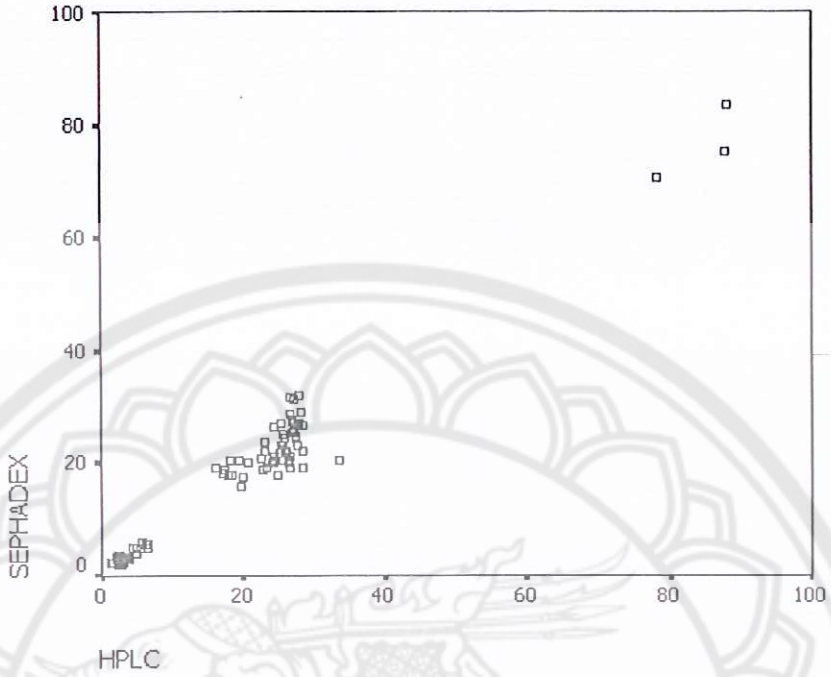
จากการศึกษาเปรียบเทียบค่า Hb A2 ที่ได้จาก microcolumn chromatography ทั้ง 2 วิธี กับวิธี HPLC โดยวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลสัดส่วนของ Hb A2 ไปในทิศทางเดียวกันกับ HPLC อย่างมีนัยสำคัญ ได้ค่า r^2 (Pearson correlation) ดังนี้

1. เปรียบเทียบค่า hemoglobin A2 ที่ได้จาก Q sepharose microcolumn chromatography กับ HPLC, $r^2 = 0.986$, $p < 0.01$ (แผนภูมิที่ 1)
2. เปรียบเทียบค่า hemoglobin A2 ที่ได้จาก DEAE sephadex microcolumn chromatography กับ HPLC, $r^2 = 0.988$, $p < 0.01$ (แผนภูมิที่ 2)

แผนภูมิที่ 1 scatterogram ของค่า Hb A2 ที่ได้ระหว่าง Q sepharose microcolumn chromatography กับ HPLC (n = 347)



แผนภูมิที่ 2 scatterogram ของค่า Hb A2 ที่ได้ระหว่าง DEAE sephadex microcolumn chromatography กับ HPLC (n = 347)



การศึกษา sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value และ accuracy ของ microcolumn chromatography ทั้ง 2 วิธี ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย โดยใช้ HPLC เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยได้ค่าดังนี้

1. Q sepharose microcolumn chromatography มี sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value และ accuracy 100% ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย (ตารางที่ 6)
2. DEAE sephadex microcolumn chromatography มี sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value และ accuracy 100% ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ตาราง 2x2 แสดงค่า sensitivity และ specificity ของ Q sepharose microcolumn chromatography ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียโดยใช้ HPLC เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัย

	กลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	กลุ่มตัวอย่างปกติ	
ผลบวก	9	0	9
ผลลบ	0	230	230
	9	230	239

ตารางที่ 7 ตาราง 2x2 แสดงค่า sensitivity และ specificity ของ DEAE sephadex microcolumn chromatography ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียโดยใช้ HPLC เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัย

	กลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	กลุ่มตัวอย่างปกติ	
ผลบวก	9	0	9
ผลลบ	0	230	230
	9	230	239

การศึกษาความเที่ยง (precision) ของการตรวจวัดระดับ Hb A2 ด้วยวิธี Q sepharose และ DEAE sephadex microcolumn chromatography โดยการตรวจวัดตัวอย่างเดียวกันซ้ำ 10 ครั้ง ในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่าให้ค่า Hb A2 ไม่ต่างกันมากนัก และด้อยกว่าความเที่ยงจากการตรวจวัดด้วย HPLC ไม่มากนักเช่นกัน ข้อมูลค่าเฉลี่ยสัดส่วนของ Hb A2 จากการตรวจวัดในตัวอย่างเลือดปกติ และพาหะเบต้าธาลัสซีเมียโดยการตรวจวัดตัวอย่างเดียวกันซ้ำ 10 ครั้ง ในช่วงเวลาเดียวกัน และค่า coefficient of variance (CV) แสดงในตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยสัดส่วนของ Hb A2 จากการตรวจวัดในตัวอย่างเลือดปกติ 1 รายซ้ำ 10 ครั้ง และค่า CV

	Hb A2 (%)	Min (%)	Max (%)	CV (%)
Q Sepharose	3.05±0.20	2.70	3.40	6.60
DEAE Sephadex	2.99±0.20	2.70	3.30	6.58
HPLC	2.38±0.04	2.30	2.40	1.77

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยสัดส่วนของ Hb A2 จากการตรวจวัดในพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 1 รายซ้ำ 10 ครั้ง และค่า CV

	Hb A2 (%)	Min (%)	Max (%)	CV (%)
Q Sepharose	5.41±0.21	5.10	5.70	3.94
DEAE Sephadex	5.48±0.30	5.00	5.90	5.49
HPLC	4.96±0.05	4.90	5.00	1.04

ข้อวิจารณ์

จำนวนตัวอย่างของกลุ่มประชากรทั่วไป (300 ตัวอย่าง) และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย (50 ตัวอย่าง) ที่รวบรวมได้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามเป้าหมายที่วางไว้ ปัญหาที่เกิดขึ้นในส่วนของตัวอย่างที่รวบรวมได้คือ การพบ abnormal Hb ในตัวอย่างจำนวน 3 ราย ซึ่ง abnormal Hb ดังกล่าวมีผลทำให้ค่าสัดส่วน Hb A2 ที่ได้เกิดการเบี่ยงเบนอย่างชัดเจน จำเป็นต้องคัดตัวอย่างเหล่านี้ออกจากการศึกษา แม้ว่าเกณฑ์การคัดออกดังกล่าวไม่ได้ถูกระบุไว้ในเกณฑ์การคัดออกของข้อเสนอโครงการวิจัยตั้งแต่แรก ทั้งนี้ปัญหาที่เกิดขึ้นเป็นข้อบกพร่องของการวางแผนดำเนินการวิจัย ซึ่งไม่ได้คิดถึงการพบ abnormal Hb ในตัวอย่างซึ่งโดยปกติพบได้ไม่บ่อยนัก แต่เป็นที่ทราบกันดีว่า abnormal Hb หลายชนิด สามารถถูกชะออกมา (elute) จาก microcolumn ปนอยู่กับ Hb A2 ที่ออกมา ทำให้ตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ได้มากกว่าที่ควรจะเป็น จึงเป็นเหตุให้ต้องคัดตัวอย่างเลือดเหล่านี้ออกในภายหลัง เพื่อไม่ให้การประมวลผลเบี่ยงเบนไป

ข้อมูลสัดส่วน Hb A2 ในกลุ่มตัวอย่างปกติ และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย ที่ได้จากการตรวจด้วย Q sepharose และ DEAE sephadex microcolumn chromatography เทียบกับ HPLC มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาค่า r^2 (Pearson correlation) มีค่าเข้าใกล้ 1 ($p < 0.01$) ช่วยยืนยันความแม่นยำของ microcolumn chromatography ทั้งสองชนิด เทียบกับ HPLC ค่า sensitivity ค่า specificity ค่า positive และ negative predictive value ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจากการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ด้วย Q Sepharose และ DEAE Sephadex microcolumn chromatography โดยใช้ HPLC เป็นการวินิจฉัยมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 100 ทำให้ผู้วิจัยเชื่อมั่นในการนำ microcolumn chromatography ทั้งสองชนิดมาใช้ในระบบการควบคุมโรคธาลัสซีเมียในประชากร

หากพิจารณาถึงข้อได้เปรียบของ Q sepharose เมื่อเทียบกับ DEAE sephadex microcolumn chromatography ได้แก่ความสะดวกของผู้ตรวจวัด เนื่องจาก Q sepharose ซึ่งเป็น anion exchanger ตัวใหม่มี working pH ที่กว้าง ทำให้การเปลี่ยนแปลงค่า pH ไม่มีผลกับสัดส่วน Hb A2 ที่วัดได้ ซึ่งทำให้วิธีการตรวจวัดสัดส่วน Hb A2 ทำได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้คุณสมบัติการนำกลับมาใช้ใหม่ได้ของ Q sepharose จะทำให้สามารถลดต้นทุนการตรวจลงได้อีก ข้อได้เปรียบเหล่านี้จะทำให้ Q sepharose microcolumn chromatography เป็นทางเลือกที่น่าสนใจมากยิ่งขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

การตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 มีความสำคัญในระบบการตรวจวินิจฉัยหาคู่สามีภรรยาที่เสี่ยงกับการได้บุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเพื่อควบคุมโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย เนื่องจากสัดส่วนของ Hb A2 มีค่าสูงขึ้นในพาหะของเบต้าธาลัสซีเมีย ดังนั้นการหาวิธีการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ที่มีความแม่นยำ เที่ยงตรง สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมียอย่างได้ผล และต้นทุนต่ำ จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาระบบการควบคุมโรคธาลัสซีเมียในประชากร HPLC เป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่งในการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 แต่เนื่องจากยังมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง และเครื่องมือมีราคาแพง ทำให้การนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเพื่อควบคุมโรคธาลัสซีเมียในประชากรจำนวนมากต้องใช้เงินลงทุนระดับหนึ่ง DEAE sephadex microcolumn chromatography เป็นวิธีที่หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลือกใช้ในการตรวจวินิจฉัยเพื่อควบคุมโรคธาลัสซีเมียในประชากรเขตภาคเหนือตอนล่างมากว่า 10 ปีแล้ว ทำการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ในหญิงตั้งครรภ์และสามีราว 3,000 คู่ต่อปี พบว่าได้ผลดี ใช้ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างน้อย วิธีดังกล่าวพัฒนามาจาก DEAE sephadex A50 microcolumn chromatography แต่ใช้ disposable syringe ขนาด 3.5 มิลลิลิตร เป็น column และ disposable syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร เป็น reservoir ซึ่งวัสดุทั้งหมดสามารถจัดเตรียมเพื่อใช้งานได้ในหน่วยวิจัยเอง ข้อที่ต้องคำนึงถึงในการตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ด้วย DEAE sephadex microcolumn chromatography คือค่า pH ของ working และ eluting buffer ที่ใช้ เนื่องจากการปรับ pH มีความสำคัญกับปริมาณ Hb A2 ที่จะถูกชะออกมา การเปลี่ยนแปลงค่า pH แม้เพียงเล็กน้อยจะมีผลกับค่าสัดส่วน Hb A2 ที่ได้ ดังนั้นเมื่อมีการนำ Q sepharose ซึ่งเป็น anion exchanger ตัวใหม่ที่มี working pH กว้าง ทำให้การเปลี่ยนแปลงค่า pH ไม่มีผลกับสัดส่วน Hb A2 ที่วัดได้ ซึ่งทำให้วิธีการตรวจวัดสัดส่วน Hb A2 ทำได้ง่ายขึ้น หน่วยวิจัยธาลัสซีเมียจึงนำ Q sepharose มาทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยเปรียบเทียบการตรวจวัดสัดส่วน Hb A2 กับ DEAE sephadex microcolumn chromatography ที่ใช้อยู่ และ HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยมุ่งหวังจะนำ Q sepharose มาใช้ในระบบการควบคุมโรคธาลัสซีเมียในประชากรเขตภาคเหนือตอนล่าง ซึ่งผลการศึกษาพบว่าค่าสัดส่วนของ Hb A2 ที่วัดได้โดยใช้ Q sepharose microcolumn chromatography ในกลุ่มตัวอย่างปกติ และกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย มีค่าใกล้เคียงกับ DEAE sephadex microcolumn chromatography และ HPLC ค่า sensitivity ค่า specificity ค่า positive และ negative predictive value ในการวินิจฉัยพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย เท่ากับร้อยละ 100 ค่า CV ต่ำ สามารถนำมาใช้ตรวจวัดสัดส่วนของ Hb A2 ทดแทน DEAE sephadex microcolumn chromatography และ HPLC ได้ นอกจากนี้หากคำนึงถึงคุณสมบัติในการนำกลับมาใช้ใหม่ได้ของ Q sepharose ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้นำกลับมาใช้ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง จะทำให้สามารถลดต้นทุนการตรวจลงได้อีก เมื่อเทียบกับ DEAE sephadex microcolumn chromatography ซึ่งมีต้นทุนที่ต่ำอยู่แล้ว อย่างไรก็ตามการนำกลับมาใช้ซ้ำของ Q sepharose ยังเป็นหัวข้อที่ต้องการการศึกษาเพิ่มเติม

บรรณานุกรม

1. Sanuguansermsri T, Tanpaiboon P, Wongmaeta S, Chomchuen S, Chamrasratanakorn T. A2 test: a simple method for the screening of beta thalassemia trait. Thai J Hematol Transf Med 2000;10:17-28.

2. Steinberg MH, Adams JG, 3rd. Hemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. Blood 1991;78:2165-77.

3. Amersham-Biosciences. Q Sepharose Fast Flow. Instruction manual. February 1997.

4. Mirasena S, Shimbhu D, Sanguansermsri M, Sanguansermsri T. The spectrum of beta thalassemia mutations in Phitsanulok province: development of multiplex ARMS for mutation detection. Naresuan University Journal 2007;15:43-53.

5. Mirasena S, Shimbhu D, Sanguansermsri M, Sanguansermsri T. Detection of beta-thalassemia mutations using a multiplex amplification refractory mutation system assay. Hemoglobin 2008;32:403-9.

6. Chamrasratanakorn T, Sanguansermsri T, Panyakeaw A. A modified microcolumn chromatography for HbA2 determination. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 1998;31:32-5.

7. Efremov GD. An evaluation of the methods for quantitation of hemoglobin A2: results from a survey of 10,663 cases. Hemoglobin 1977;1:845-60.

8. Tangvarasittichai O, Tangvarasittichai S. An effective method for hemoglobin E detection: DEAE sepharose microcolumn. Lab Hematol 2009;15:10-2.

9. Tangvarasittichai S, Tangvarasittichai O, Jermnim N. Comparison of fast protein liquid chromatography (FPLC) with HPLC, electrophoresis & microcolumn chromatography techniques for the diagnosis of beta-thalassaemia. Indian J Med Res 2009;129:242-8.

i 6990344
12 มิ.ย. 2558
สำนักหอสมุด

Output ที่ได้จากโครงการ

ตัวชี้วัดเพื่อการประเมินผลสำเร็จของโครงการ

ประเภท	ผลงาน	จำนวน
การตีพิมพ์และเผยแพร่	13.1 ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มีค่า Impact Factor	.... เรื่อง
	13.2 ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (ไม่มีค่า Impact Factor)	.... เรื่อง
	13.3 ตีพิมพ์ในวารสารระดับประเทศ	... เรื่อง
	13.4 นำเสนอในการประชุมวิชาการในระดับนานาชาติ ที่มีการตีพิมพ์บทความบน Proceedings	.... เรื่อง
	13.5 นำเสนอในการประชุมวิชาการในระดับชาติ ที่มีการตีพิมพ์บทความบน Proceedings	..1.. เรื่อง
	13.6 บทความวิชาการ ตำรา หนังสือที่มีการรับรองคุณภาพ	.... เรื่อง
การใช้ประโยชน์	13.7 ถ่ายทอดผลงานวิจัย / เทคโนโลยีสู่กลุ่มเป้าหมาย และได้รับการรับรองการใช้ประโยชน์จากหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง	...1.. เรื่อง
	13.8 ได้สิ่งประดิษฐ์ อุปกรณ์ เครื่องมือ หรืออื่นๆ เช่น ฐานข้อมูล Software ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป	.... ผลงาน
การจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา	13.9 อนุสิทธิบัตร	.... ผลงาน
	13.10สิทธิบัตร	.... ผลงาน