

# 三種不同血紅素 A<sub>2</sub> 分析法對地中海貧血診斷可靠性的探討

劉素卿 施木青<sup>1</sup> 黃惠農<sup>1</sup> 黃瓊雪<sup>2</sup> 詹雯玲<sup>3</sup> 劉玉<sup>4</sup> 彭慶添 張建國<sup>1,3</sup>

中國醫藥學院附設醫院 兒科 檢驗醫學部<sup>1</sup> 醫學研究部<sup>3</sup> 彰化基督教醫院檢驗部<sup>2</sup> 佑康公司<sup>4</sup>

**背景** 地中海貧血是台灣地區相當常見的遺傳病，它是因血紅素基因突變造成。臨床上，在分辨甲型或乙型地中海貧血主要是根據 HbA<sub>2</sub> 的值，一般的檢驗室是以 HbA<sub>2</sub> 值在 4.0% 為臨界點，當 MCV ≤ 80fl，同時又沒有缺鐵時，HbA<sub>2</sub> ≥ 4%，則診斷為乙型地中海貧血；同樣的情形，而 HbA<sub>2</sub> < 4% 時，則診斷為甲型地中海貧血。到底那一種方法準確，過去一直有相當的爭論，而造成這些爭論的最主要原因是沒有精確的參考方法。最近十多年來，由於分子生物技術的進步，使我們能真正的偵測到血紅素基因突變的所在，因此，用它來當做參考方法是最可靠的。

**方法** 我們利用：1) cellulose acetate 電泳法；2) agarose gel 電泳法；3) high performance liquid chromatography (HPLC) 等方法偵測 HbA<sub>2</sub> 的值，然後再利用 PCR 的方法分析基因突變所在，以便判斷三種方法的準確性。

**結果** 對於甲型地中海貧血的診斷，HbA<sub>2</sub> 的值以 HPLC 的方法最可靠，其次是 agarose，而 cellulose 最不可靠；在乙型地中海貧血的診斷方面，三種方法偵測 HbA<sub>2</sub> 的值，其精確度相近，但有十分之一的個案會被誤判。而 HbA<sub>2</sub> 的值以 4.0% 為臨界點較合理。

**結論** 傳統上，利用常用的三種方法偵測 HbA<sub>2</sub> 的值，藉以診斷甲型或乙型地中海貧血，仍有相當大的誤差，我們建議在產前診斷時，只要夫妻中有一方為乙型地中海貧血，則雙方及胎兒一定要同時做甲型及乙型血紅素基因的突變分析，以防止 HbA<sub>2</sub> 的值不精確所引起的誤判。(中台灣醫誌 2002;7:44-8)

## 關鍵詞

瓊膠電泳法，醋酸纖維膜，HbA<sub>2</sub>，液相層析儀，地中海貧血

## 前言

地中海貧血是台灣地區相當常見的遺傳病，它是因血紅素基因突變造成。在出生後血紅素以 HbA 為主，佔 95% 以上，其它還有少量的 HbA<sub>2</sub> (<4%) 及 HbF (<1%)。HbA 是由二個分子甲型血紅素蛋白 ( $\alpha$ -globin) 及二個分子乙型血紅素蛋白 ( $\beta$ -globin) 形成四倍體

( $\alpha_2\beta_2$ ) 的結構。當甲型血紅素缺乏時，稱甲型地中海貧血；而乙型血紅素缺乏時，則稱乙型地中海貧血。甲型地中海貧血是因甲型血紅素基因突變造成。而乙型地中海貧血是因乙型血紅素基因突變造成。臨床上，在分辨甲型或乙型地中海貧血主要是根據 HbA<sub>2</sub> 的值，一般的檢驗室是以 HbA<sub>2</sub> 值在 4.0% 為臨界點 (但也有以 3.5% 為標準)。當 MCV ≤ 80fl，同時又沒有缺鐵時，HbA<sub>2</sub> ≥ 4%，則診斷為乙型地中海貧血；同樣的情形，而 HbA<sub>2</sub> < 4% 時，則診斷為甲型地中海貧血 [1-5,28]。

偵測 HbA<sub>2</sub> 值的方法，常用的有四種方法：

聯絡作者：張建國

地址：404 台中市北區育德路 2 號

中國醫藥學院附設醫院 醫學研究部

收文日期：7/9/2001 修改日期：10/25/2001

接受日期：12/14/2001

1) cellulose acetate 電泳法；2) agarose gel 電泳法；3) high performance liquid chromatography (HPLC)；4) DE-52 microchromatography [6]。到底那一種方法準確，過去一直有相當的爭論[7-18]，而造成這些爭論的最主要原因是沒有精確的參考方法。最近十多年來，由於分子生物技術的進步，使我們能真正的偵測到血紅素基因突變的所在，因此，用它來當做參考方法是最可靠的。

由於 HPLC 及 DE-52 microchromatography 相似，因此，在本研究中，我們利用血紅素基因的突變偵測法，來評估 cellulose acetate、agarose 及 HPLC 等，三種常見的 HbA<sub>2</sub> 檢驗法，對於地中海貧血診斷的精確性。

### 材料及方法

我們以中國醫藥學院附設醫院從民國 88 年 8 月至民國 89 年 4 月，因臨床上診斷有貧血而做血紅素電泳的檢查，隨機抽樣 191 例個案。所有病人之 MCV 均小於 80fl，而 Hb 小於 12 gm/dL，其年齡從 18 歲到 62 歲，平均年齡為 35 歲，其中男性佔 51 例，女性佔 140 例。同時以 cellulose acetate 電泳法，agarose gel 電泳法及 HPLC 來分析 HbA<sub>2</sub> 的值；且利用 alkaline lysis 的方法抽取這些個案白血球中的 DNA [19]。Cellulose acetate 電泳的方法是根據 Helena 公司的 protocol；agarose gel 電泳法則利用 Helena 公司的 protocol；而 HPLC 則利用 Primus 公司的 CLC 385 機型偵測及其所提供的�方法。

#### 基因分析

甲型地中海貧血的基因分析：甲型地中海貧血的基因病變以 deletion 為主，長的 deletion 包括東南亞型，菲律賓型及泰國型；而短的 deletion 則包括  $\alpha^{3.7}$  缺損， $\alpha^{4.2}$  缺損及合併有 HbG-Taichung 的  $\alpha^{4.2}$  缺損。我們利用過去已建立的方法來偵測這些突變[20-23]，至於有疑問的個案則進一步利用 Southern blot 的方法確認[24]。

乙型地中海貧血的基因分析：乙型地中海貧血的基因病變以點的突變為主，我們利用過去所建立的 ACRS 的方法[25-26]，分析所有中國人常見的突變，有疑問的個案則利用直接定序的方法[27]，做進一步的確認。至於乙型血紅素基因缺

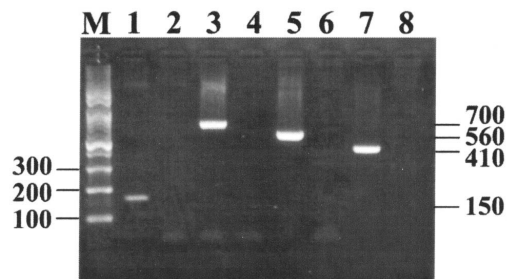


圖1 本圖顯示分析不同型  $\alpha$ -thalassemia-1 的結果。東南亞型缺損利用兩組 primers 來偵測其結果，顯示在 lanes 1 及 3；而菲律賓型的缺損利用不同的 primers，其 PCR 的結果產生 560 bp 的產物 (lane 5)；而泰國型的缺損利用不同的 primers 則 410 bp 的產物 (lane 7)；正常沒有以上的缺損者，則沒有 PCR 產物 (lanes 2, 4, 6 及 8)。M：100 bp 標示。

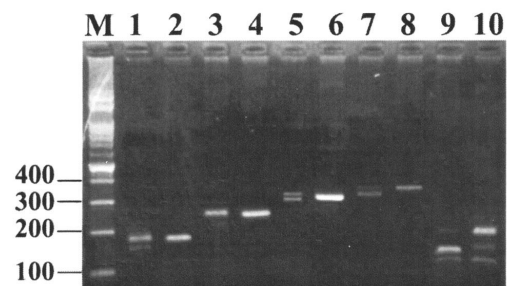


圖2 本圖顯示用 ACRS 或 PCR-RFLP 分析乙型地中海貧血的結果。乙型地中海貧血突變中的 codon 17 AAG  $\rightarrow$  TAG，IVS2 nt 654 C  $\rightarrow$  T，-28 promoter A  $\rightarrow$  G，codon 27/28+C 及 codon 41/42 少 4 個鹼基等，突變的 PCR 產物可分別利用核酸內切酶 Alu I (lane 1)，Rsa I (lane 3)，EcoR I (lane 5)，Nla IV (lane 9) 及 Taq I (lane 7) 切割。而 lanes 2, 4, 6, 8 及 10 則為正常沒有突變的例子。M：100 bp 標示。

損而造成的乙型地中海貧血，則因其電泳的結果會出現 HbF 的值大於 10% 以上，而且 HbA<sub>2</sub> 值在正常範圍內，所以這類的病人不包括在本研究中。

### 結果

在 191 例個案中，有 92 例經基因診斷為地中海貧血的帶因者，其中有 28 例有乙型血紅素基

Table 1. The effect of different method on HbA<sub>2</sub> of  $\alpha$ -thalassemia-1

Method	Agarose	Cellulose	HPLC
HbA <sub>2</sub> value			
HbA <sub>2</sub> ≥ 3.5	3/64	14/64	0/64
HbA <sub>2</sub> ≥ 4.0	1/64	4/64	0/64

因的突變，而 64 例有甲型血紅素基因大的缺損；甲型地中海貧血常見的東南亞缺損有 62 例，菲律賓型缺損有 2 例 (Fig. 1)。乙型血紅素基因的突變 codon 41/42，少 4 個鹼基有 6 例，IVS 2 nt 654 C→T mutation 12 例，codon 17 A→T mutation 3 例，-28 promoter A→G 5 例，codon 27/28 +C 有 2 例 (Fig. 2)。

在甲型地中海貧血的 64 例個案中，以 cellulose acetate 電泳法分析，有 14 例 HbA<sub>2</sub> ≥ 3.5%，其中有 4 例 HbA<sub>2</sub> ≥ 4.0%；而以 agarose gel 分析則有 3 例 HbA<sub>2</sub> ≥ 3.5%，其中有 1 例 HbA<sub>2</sub> ≥ 4.0%；而以 HPLC 分析時，則所有 64 例的案例均 HbA<sub>2</sub> ≤ 3.5% (Table 1)。

在乙型地中海貧血的個案中，以 cellulose acetate 電泳法分析，28 例中有 3 例 HbA<sub>2</sub> < 3.5%，此 3 例同時也小於 4.0%；而以 agarose gel 分析，28 例有 3 例 HbA<sub>2</sub> < 4.0%，其中有 2 例甚至少於 3.5%；以 HPLC 分析時，有 2 例 HbA<sub>2</sub> < 3.5% (Table 2)。

## 討論

臨床上，區分不同型地中海貧血，最主要是靠 HbA<sub>2</sub> 的值，而至少有三種以上的方法可用來決定 HbA<sub>2</sub> 的值。過去在評估這些方法的準確性時，主要是利用病人的臨床資料做為地中海貧血分型的依據，然後再以這些病人當做評估的標準。因此，在判斷那些 HbA<sub>2</sub> 明顯不正常的乙型地中海貧血，準確性可能還好，但對於那些 HbA<sub>2</sub> 在正常或 borderline 的病人則無法評估，也就是無法看到 HbA<sub>2</sub> 正常的乙型地中海貧血的病人，同樣也無法評估 HbA<sub>2</sub> 的值大於或等於 4.0 以上的甲型地中海貧血，因此造成只評估 positive 的結果，對於 false negative 或 false positive 的 cases 則無法評估。這種結果的產生，最主要是評估的參考方法不夠精確。而利用基因檢查的結果做為評估的參考方法，則可克服

Table 2. The effect of different method on HbA<sub>2</sub> of  $\beta$ -thalassemia

Method	Agarose	Cellulose	HPLC
HbA <sub>2</sub> value			
HbA <sub>2</sub> < 3.5	2/28	3/28	2/28
HbA <sub>2</sub> < 4.0	3/28	3/28	2/28

此困難，因此，以這種方法當做標準方法，來比較其它方法的準確性才是最可靠的方法。

我們比較了台灣常用的三種偵測 HbA<sub>2</sub> 的方法，結果顯示，若以 HbA<sub>2</sub> 的值小於 3.5% 為評估甲型地中海貧血的參考值，是相當不可靠的方法，特別是用 cellulose acetate 電泳法，有將近 20% 甲型地中海貧血的病人其 HbA<sub>2</sub> 的值是在 3.5% 與 4.0% 之間，其次是 agarose gel 電泳法。一般而言 HPLC 是比較可靠的方法，特別在診斷甲型地中海貧血方面，其準確度高達 100%。相對的，以 HbA<sub>2</sub> 大於或等於 3.5% 做為診斷乙型地中海貧血，則將近 10% 的病人低於此值，因此會被誤判為甲型地中海貧血。不管三種方法的那一種，其誤差皆將近 10%，而若以 4.0% 當作診斷的參考值時，在診斷甲型地中海貧血方面，cellulose acetate 電泳法的偽陽性病例則降到 5.7% 左右，而 agarose gel electrophoresis 則降到 1.5% 左右，當然 HPLC 的方法是 100% 的正確。而在診斷乙型地中海貧血方面，三種方法相差不大，其偽陰性的個案約在 10% 左右。由以上的結果看來，HbA<sub>2</sub> 的參考值以 4.0 較為妥當，而偵測 HbA<sub>2</sub> 值的方法則以 HPLC 較為精確。

上述之三種方法，對於乙型地中海貧血的診斷仍然有 10% 左右的誤差，因此在做產前診斷時，這樣的誤差可能會造成很嚴重的後果，也就是夫婦可能為 HbA<sub>2</sub> 正常的乙型地中海貧血被當做缺鐵性貧血或甲型地中海貧血，而沒有做進一步的基因檢查，或只做甲型地中海貧血，而沒做乙型地中海貧血的基因檢查。因此，我們認為在做產前診斷時，夫婦中若有一位有乙型地中海貧血，另一位應該也一併做乙型地中海貧血的基因檢查，以便防止重型乙型地中海貧血個案的產生。

## 參考文獻

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia

- Syndromes. Oxford: Blackwell Scientific, 1981.
- Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspect. Philadelphia: WB Saunders, 1986.
  - Chang JG, Liu TC. Advances in diagnosis of hemoglobinopathies. *J Genet Mol Bio* 1996;7:37-48.
  - Chang JG, Liu HJ. Molecular diagnosis of thalassemia in Taiwan. [Review] *Kaohsiung J Med Sci* 1995;11:371-8.
  - Ko TM, Xu X. Molecular study and prenatal diagnosis of alpha- and beta-thalassemias in Chinese. *J Formos Med Assoc* 1998;97:5-15.
  - Huisman THJ. The Hemoglobinopathies. In *Methods in Hematology*. Vol. 15, p.1-89. London. Churchill Living Stone Company, 1986.
  - Samperi P, Testa R, Mancuso M, et al. Comparative approach to the evaluation of hemoglobin A2 by two different methods: high-performance liquid chromatography and DE-52 microchromatography. *Acta Haematol* 1990; 83:179-82.
  - Ainley MJ, Mathieson B, Saary M. Comparison of microcolumn chromatography and laser densitometry of isoelectric focusing strip for the quantitation of HbA2 and HbS. *Clin Lab Haematol* 1988;10:461-5.
  - Turpeinen U. Liquid-chromatographic determination of hemoglobin A2. *Clin Chem* 1986; 32:999-1002.
  - Baine RM, Brown HG. Evaluation of a commercial kit for microchromatographic quantitation of hemoglobin A2 in the presence of hemoglobin S. *Clin Chem* 1981;27:1244-7.
  - Gottfried EL, Wall B, Robertson NA. Reliable estimation of hemoglobin A2 concentration by electrophoresis with densitometry. *Am J Clin Pathol* 1979;72:415-20.
  - Schmidt RM, Brosious EM. Quqntitation of hemoglobin A2. An interlaboratory study. *Am J Clin Pathol* 1979;71:534-9.
  - Moors A, Melis-Liekens J, De Vlieger-Bensel M, et al. Evaluation of a simplified microchromatographic technique for hemoglobin A2 determination. *Acta Haematol* 1979;61:15-26.
  - Brosious EM, Wright JM, Baine RM, et al. Microchromatographic methods for hemoglobin A2 quantitation compared. *Clin Chem* 1978; 24:2196-9.
  - Recommendations for selected methods for quantitative estimation of HbA2 and for HbA2 reference preparation. International Committee for Standardization in Haematology. *Br J Haematol* 1978;38:573-8.
  - 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.
  - Nastev D, Efremov GD, Petkov G. A test tube method for quantitation of hemoglobin A2 using DE 52 cellulose. *Hemoglobin* 1977;1:445-59.
  - Schmidt RM, Rucknagel DL, Necheles TF. Comparison of methodologies for thalassemia screening by HbA2 quantitation. *J Lab Clin Med* 1975;86:873-82.
  - Shih MC, Yang LH, Wang NM, et al. Genomic typing of human red cell miltenberger glycoporphins in a Taiwanese population. *Transfusion* 2000;40:54-61.
  - Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, et al. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood* 2000;95:360-2.
  - Liu YT, Old JM, Miles K, et al. Rapid detection of alpha-thalassemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. *Br J Haematol* 2000;108:295-9.
  - Chang JG, Liu TC, Chiou SS, et al. Rapid detection of -alpha 4.2 deletion of alpha-thalassemia-2 by polymerase chain reaction. *Ann Hematol* 1994;69:205-9.
  - Chang JG, Lee LS, Lin CP, et al. Rapid diagnosis of alpha-thalassemia-1 of southeast Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction. *Blood* 1991;78:853-4.
  - Lee HH, Cheung WF, Chang JG, et al. Molecular analysis of hemoglobin H disease in Taiwan. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1988;12:52-5.
  - Chang JG, Chen PH, Chiou SS, et al. Rapid diagnosis of beta-thalassemia mutations in Chinese by naturally and amplified created restriction sites. *Blood* 1992;80:2092-6.
  - Chiou SS, Liu TC, Chang TT, et al. Prenatal and molecular diagnosis of beta-thalassemia major in Taiwan by naturally and amplified created restriction sites. *Int J Hematol* 1993;59:1-8.
  - Chiou SS, Chang TT, Chen PH, et al. Molecular basis and haematological characterization of beta-thalassaemia major on Taiwan, with a mutation of IVS-1 3' end TAGRGAG in a Chinese patient. *Br J Haematol* 1993;83:112-7.
  - Ko TM, Chen TA, Hsieh MI, et al. Alpha-thalassemia in the four major aboriginal groups in Taiwan. *Hum Genet* 1993;92:79-80.

# Evaluation of the Accuracy of HbA<sub>2</sub> for Diagnosis of Thalassemia Using Three Traditional Methods

Su-Ching Liu, Mu-Chin Shih<sup>1</sup>, Fe-Long Huang<sup>1</sup>, Chiung-Hsueh Huang<sup>2</sup>, Wen-Ling Chan<sup>3</sup>,  
Jade Liu<sup>4</sup>, Ching-Tien Peng, Jan-Gowth Chang<sup>1,3</sup>

Department of Pediatrics,<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine,<sup>3</sup>Department of Medical Research,  
China Medical College Hospital, Taichung;

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Changhua Christian Hospital;

<sup>4</sup>Progressive Group, Inc., Taiwan, R.O.C.

**Background.** Thalassemia is a common hereditary disease in Taiwan. Clinically, differentiating between the different types of thalassemia ( $\alpha$  or  $\beta$ ) depends on the HbA<sub>2</sub> value. There are at least three methods used to measure HbA<sub>2</sub>, however, there is no consensus on which method is most accurate. We compared these methods in order to explore their accuracy.

**Methods.** We used: 1) cellulose acetate electrophoresis; 2) agarose gel electrophoresis and 3) high performance liquid chromatography (HPLC) to detect the HbA<sub>2</sub> values, and then used a PCR-based method to detect the mutations of hemoglobin genes in 92 cases of thalassemia to evaluate the accuracy of these three methods.

**Results.** Out of 64 cases with  $\alpha$ -thalassemia, 14 cases were determined by the cellulose method to have HbA<sub>2</sub>  $\geq$  3.5%, and 4 to have HbA<sub>2</sub>  $\geq$  4.0%; the agarose gel electrophoresis method detected 3 cases with HbA<sub>2</sub>  $\geq$  3.5% and 1 with HbA<sub>2</sub>  $\geq$  4.0%; there were no cases with HbA<sub>2</sub> levels over 3.5% using the HPLC method. Out of 28 cases with  $\beta$ -thalassemia minor, 3 cases using the cellulose acetate method, 2 cases using the agarose gel method, and 2 cases using the HPLC method were found to have HbA<sub>2</sub> levels less than 3.5% or 4.0%.

**Conclusions.** The detection of HbA<sub>2</sub> using traditional methods is not accurate enough to be used for prenatal diagnosis. We suggest that both couple and fetus be analyzed for both  $\alpha$  and  $\beta$  thalassemic mutations when either couple has  $\beta$ -thalassemia minor. (Mid Taiwan J Med 2002;7:44-8)

## Key words

agarose gel electrophoresis method, cellulose acetate method, HbA<sub>2</sub>, HPLC, thalassemia

---

Received : July 9, 2001.

Revised : October 25, 2001.

Accepted : December 14, 2001.

Address reprint requests to : Jan-Gowth Chang, Departments of Laboratory Medicine and Medical Research, China Medical College Hospital, No 2, Yuh-Der Road, Taichung 404, Taiwan, R.O.C.