

อัตราการตรวจพบยีน Southeast Asian Ovalocytosis (SAO) ในผู้ป่วย ที่ส่งตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียจากโรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์

วัชรพงษ์ กาวน^{1,2}, สุภาวดี แยมศรี^{2*}, กุลนภา พูเจริญ², อมรา ตือระ³ และ สุพรรณ พูเจริญ^{2*}

Received: April 24, 2019

Revised: May 1, 2019

Accepted: May 8, 2019

บทคัดย่อ

ภาวะเม็ดเลือดแดงรูปไข่ชนิดเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หรือ Southeast Asian Ovalocytosis (SAO) และธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง และมีรายงานความชุกสูงในภาคใต้ของประเทศไทย การที่ยีน SAO และยีนธาลัสซีเมียเป็นอิสระต่อกัน จึงมีโอกาที่จะพบผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียมียีน SAO ร่วมด้วย การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการหาอัตราการตรวจพบยีน SAO ในผู้ที่เข้ารับบริการที่โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์แล้วส่งตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่หน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยทำการตรวจยีน SAO ด้วยวิธี GAP-PCR จากตัวอย่างที่ส่งตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย จำนวน 326 ตัวอย่าง พบ 21 ตัวอย่าง มียีนแฝง SAO คิดเป็นร้อยละ 6.4 (95% CI = 4.0-9.6) และมีตัวอย่างที่มียีนธาลัสซีเมียจำนวน 292 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 89 โดยพบพาหะฮีโมโกลบินอีมากที่สุดจำนวน 107 ตัวอย่าง (ร้อยละ 36.6) พาหะฮีโมโกลบินอีทั้งหมดนี้ พบ 8 ตัวอย่างที่มียีน SAO ร่วมด้วย เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงระหว่าง 2 กลุ่มนี้ พบว่า ค่า MCV MCH และ RDW ในกลุ่มที่มียีน SAO มีแนวโน้มสูงกว่า กลุ่มที่ไม่มียีน SAO ค่า MCV ที่สูงขึ้นจึงอาจรบกวนการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียได้ นอกจากนี้การพบยีน SAO ร่วมกับธาลัสซีเมียในอัตราที่สูงแสดงถึงโอกาสที่จะพบผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่มียีน SAO ร่วมด้วยในภูมิภาคนี้ ในด้านอาการทางคลินิกนั้นไม่สามารถสรุปได้ว่าการมียีน SAO มีผลต่อกระทบต่ออาการของผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียหรือฮีโมโกลบินผิดปกติหรือไม่ เนื่องจากไม่ทราบประวัติการเจ็บป่วยและการรักษาของผู้ป่วย การศึกษาไปข้างหน้าร่วมกับแพทย์ จะทำให้ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับผลกระทบของการมียีน SAO ในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียหรือฮีโมโกลบินผิดปกติได้ชัดเจนขึ้น

คำสำคัญ: ภาวะเม็ดเลือดแดงรูปไข่ชนิดเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, SAO, ธาลัสซีเมีย

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

³ แผนกกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ จังหวัดนราธิวาส

* ผู้รับผิดชอบบทความ



Positive rate of Southeast Asian Ovalocytosis (SAO) among patients sent for thalassemia diagnosis from Naradhiwas Rajanagarindra hospital

Watcharaphong Kawon^{1,2}, Supawadee Yamsri^{2*}, Goonnapa Fucharoen², Amara Duereh³ and Supan Fucharoen²

Abstract

Southeast Asian Ovalocytosis (SAO) and thalassemia are inherited red blood cell disorders causing hemolysis. A high prevalence of SAO has been found in southern Thailand where thalassemia is common. Therefore, patients with co-inheritance of these two genetic abnormalities can be encountered. In this study, SAO was screened in patients at Naradhiwas rajanagarindra hospital whose blood specimens were obtained at the Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University for thalassemia diagnosis. Gap-PCR analysis was used to identify the SAO mutation. From 326 subjects examined, 21 had SAO mutation (6.4%; 95% CI = 4.0-9.6). Two hundred ninety-two subjects carried thalassemia gene (89%), the most common one (n = 107) was hemoglobin E. Out of these 107 subjects, eight were positive for SAO. Comparison of red blood cell parameters between these two groups showed higher MCV, MCH and RDW values in those with SAO as compared to those without SAO. This data indicated a high opportunity to find co-inheritance of SAO and thalassemia in the region. The increased MCV value with this combined defects would further alter thalassemia screening. Without clinical data, it is however difficult to draw any effect of SAO on the clinical presentation of thalassemia and hemoglobinopathies. Further study in collaboration with clinicians is required to provide additional information related to this matter

Keywords: Southeast Asian Ovalocytosis, SAO, Thalassemia

¹ Master degree student, Medical Science Program, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province

² Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province

³ Department of Paediatrics, Naradhiwas Rajanagarindra Hospital, Narathiwat Province

*Corresponding author (e-mail: supawadee@kku.ac.th)

บทนำ

โรคเม็ดเลือดแดงรูปไข่ชนิดเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หรือ Southeast Asian Ovalocytosis (SAO) เป็นโรคหนึ่งในกลุ่มของ Hereditary Elliptocytosis (HE) ซึ่งมีความผิดปกติที่ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยถูกเรียกในชื่อต่างๆ เช่น Elliptical stomatocytosis Stomatocytic Elliptocytosis หรือ Melanesian Elliptocytosis⁽¹⁾ เกิดจากความผิดปกติของยีน AE1 (anion exchanger 1) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 และมีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน band 3 ซึ่งเป็น peripheral membrane protein ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ที่สำคัญคือเป็นส่วนประกอบโครงสร้างของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง (red cell membrane cytoskeleton) และทำหน้าที่เป็น anion exchange⁽²⁻³⁾ SAO เกิดจากการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์เบสจำนวน 27 นิวคลีโอไทด์เบส ระหว่างโคดอนที่ 400 – 408 ส่งผลให้มีกรดอะมิโน 9 ตัวขาดหายไป ดังนั้นเมื่อโปรตีน band 3 มีความผิดปกติจึงส่งผลให้จับกับโปรตีน ankyrin ไม่ได้ ทำให้โครงสร้างของผนังเม็ดเลือดแดงมีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่สามารถคงรูปร่างปกติไว้ได้ ทำให้เห็นรูปร่างของเม็ดเลือดแดงมีรูปร่างที่ยาวขึ้น หรือรูปไข่ (ovalocytes) และบางตัวจะมีแท่งพาดตามขวาง 1-2 แท่ง บริเวณตรงกลางของเซลล์ทำให้เม็ดเลือดแดงมีลักษณะเหมือนตัวอักษรกรีกที่เรียกว่า “Theta” ทำให้ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงมีความแข็งมากขึ้น (increased rigidity) ไม่ยืดหยุ่น ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ง่ายขึ้น และมีอายุอยู่ในกระแสเลือดได้สั้นลง⁽⁴⁾ และหากพบร่วมกับการกลายพันธุ์ชนิดอื่นๆ ของยีน AE 1 ที่ควบคุมการแลกเปลี่ยน Cl^-/HCO_3^- ที่ renal tubule อาจส่งผลให้เกิดภาวะ distal renal tubular acidosis (dRTA) ได้⁽⁵⁾ โดยทั่วไปผู้ที่ป่วยเป็นพาหะ SAO (heterozygote) ที่ไม่มีภาวะอื่นแทรกซ้อน มักไม่มีอาการแสดงทางคลินิกในขณะที่ผู้ที่มียีน SAO แบบ homozygotes จะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์⁽⁴⁾ SAO มีรายงานความชุกสูงในพื้นที่ที่พบมาลาเรีย (malaria) ได้แก่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แถบประเทศมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และภาคใต้ของประเทศไทย⁽⁶⁻⁸⁾

ธาลัสซีเมียเป็นภาวะเลือดจางทางพันธุกรรมที่พบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และในประเทศไทยเองก็มีการรายงานอุบัติการณ์ที่สูง ซึ่งสาเหตุความผิดปกติของธาลัสซีเมียนั้นมาจากความผิดปกติของยีนโกลบินที่สำคัญคืออัลฟาและบีตา-โกลบินยีน ทำให้สังเคราะห์ฮีโมโกลบินเอ ในเม็ดเลือดแดงได้น้อยลงหรือไม่ได้เลย ทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ เปราะและถูกทำลายง่ายกว่าปกติ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการขนส่งออกซิเจน เนื่องจากฮีโมโกลบินเอ เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในการลำเลียงออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย ทำให้ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่ได้รับยีนผิดปกติมาจากทั้งพ่อและแม่นั้นมีอาการซีดเหลืองง่าย อ่อนเพลีย ตับม้ามโต และรุนแรงที่สุดคือเสียชีวิตตั้งแต่แรกคลอด⁽⁹⁻¹⁰⁾

แม้ว่าผู้มียีน SAO แบบ heterozygote นั้นจะไม่มีอาการทางคลินิก แต่มีรายงานพบผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกิน (iron overload) ที่เกิดจากการมียีน SAO ร่วมกับบีตาธาลัสซีเมีย⁽¹¹⁾ เนื่องจาก SAO และธาลัสซีเมียนั้นเป็นอิสระต่อกัน ทำให้สามารถพบ SAO ร่วมกับธาลัสซีเมียได้ และเนื่องจากความผิดปกติทั้งสองชนิดนี้ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกง่ายกว่าปกติ จึงเป็นไปได้ว่าการพบความผิดปกติทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน อาจนำไปสู่การแตกของเม็ดเลือดแดงที่รุนแรงขึ้น และอาจมีผลต่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียโดยการตรวจคัดกรองเบื้องต้นได้

โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ ได้ส่งตัวอย่างเลือดมารับการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ที่หน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทยมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นประจำ และจากการศึกษาของ Ngouprommin L และคณะ⁽⁸⁾ ได้รายงานพบความถี่ของยีน SAO สูงสุดในประเทศไทยที่จังหวัดนราธิวาส เท่ากับ 0.03 การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการหาสัดส่วนการตรวจพบยีน SAO ในผู้ที่เป็นธาลัสซีเมีย เพื่ออธิบายผลกระทบของการมี SAO ในผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียต่อค่าทางโลหิตวิทยาต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมที่เหมาะสมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ cross sectional study โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่เหลือจากงานประจำวันของหน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ส่งมาตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ระหว่าง เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 - มิถุนายน พ.ศ. 2561 ทุกรายจำนวน 326 ตัวอย่าง อายุเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 21 ± 14 ปี จำแนกเป็นผู้ที่มีอายุ <15 ปี, 15-60 ปี และ >60 ปี ร้อยละ 33.3, 65.9 และ 0.8 ตามลำดับ งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น เลขที่ HE 602269

2. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ค่าโลหิตวิทยาของตัวอย่างทั้งหมดตรวจโดยใช้เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Beckman Coulter DxH 800 hematology analyzer (Beckman Coulter, Miami, FL) ณ โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ การตรวจวินิจฉัยชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography, HPLC (Variant TM; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) หรือเครื่อง Capillary Electrophoresis (CapillaryS 2 Flex Piccing; Sebia, Lisses, France) และการตรวจดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย ดำเนินการ ณ หน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตัวอย่างทุกรายได้รับการตรวจยีน α^0 -thalassemia (SEA and THAI deletion), α^+ -thalassemia ($-\alpha^{3.7}$ และ $-\alpha^{4.2}$ kb deletion) ด้วยวิธี gap-PCR (12-13) ตรวจยีน Hb Constant Spring และ Hb Pakse' ด้วยวิธี allele specific PCR (ASPCR)⁽¹⁴⁾ การตรวจยีน β -thalassemia, Hb E และฮีโมโกลบินผิดปกติตรวจในตัวอย่างที่ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินบ่งชี้⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

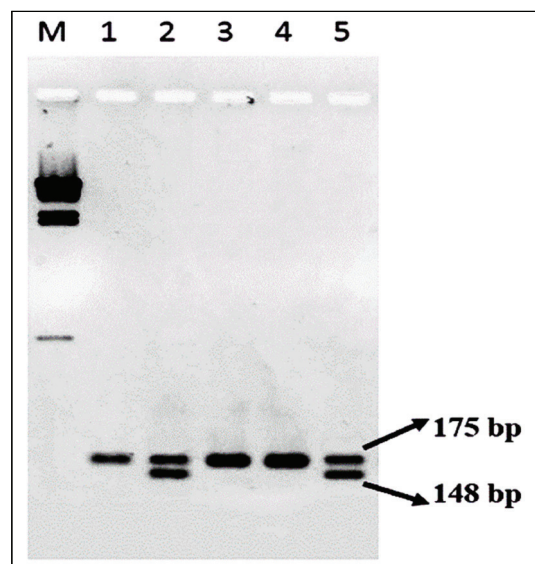
3. การตรวจวินิจฉัยยีน SAO

ยีน SAO ถูกตรวจด้วยวิธี Gap-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SA1: 5'GGGCCC AGATGACCCT CTGC 3' และ

SA2 5' C ACCCGCCATC ACCTTCGGC 3' ตามวิธีของ Fucharoen G และคณะ⁽¹⁸⁾ ณ หน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผลผลิตของพีซีอาร์แยกด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide solution แล้วอ่านผลภายใต้แสงยูวี (UV light) โดยในรายที่ไม่พบยีน SAO จะพบเพียง fragment ขนาด 175 bp เท่านั้น แต่ถ้าหากพบยีน SAO แบบ heterozygote จะมีทั้ง fragment ขนาด 175 bp และ 148 bp ดังแสดงใน รูปที่ 1

4. สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

อธิบายลักษณะข้อมูลทางโลหิตวิทยาด้วยสถิติเชิงพรรณนา รายงานอัตราการตรวจพบยีน SAO เป็นร้อยละและช่วงเชื่อมั่นที่ 95 (95% confidence interval, CI) เปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาระหว่างกลุ่มที่พบยีน SAO และกลุ่มที่ไม่พบยีน SAO ใช้สถิติ Two samples t-test หรือ Mann-Whitney U test วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab® 18 กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p\text{-value} < 0.05$



รูปที่ 1 ผล gel electrophoresis ของการตรวจหายีน SAO ด้วย วิธี Gap-PCR

จากภาพ fragment of 175 bp และ 148 bp แสดงถึง normal allele และ mutant allele ตามลำดับ

M = Lambda/Hind III marker; 1, 3, 4 = Normal; 2, 5 = Heterozygous SAO

ผลการศึกษา

1. อัตราการตรวจพบยีน SAO ของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ที่ส่งตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย

จากตัวอย่างจำนวน 326 ตัวอย่าง มีตัวอย่างจำนวน 21 ราย ที่ให้ผลบวกกับยีน SAO คิดเป็นร้อยละ 6.4 (95% CI = 4.0 – 9.6) มีตัวอย่างจำนวน 292 ตัวอย่าง ที่มียีนธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 89 สามารถจำแนกตามจีโนไทป์ได้ทั้งหมด 35 ชนิด ซึ่งจีโนไทป์ที่พบมากที่สุดคือพาหะฮีโมโกลบินอี (Heterozygous Hb E) จำนวน 107 ตัวอย่าง (ร้อยละ 36.6) และจีโนไทป์ที่พบรองลงมาคือ อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA deletion) ร่วมกับฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง (Hb Constant Spring) และอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA deletion) ร่วมกับอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 (3.7 kb deletion) จำนวน 23 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.9) และ 20 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.8) ตามลำดับ ตรวจพบ เดลตา-บีตา ธาลัสซีเมีย ($\delta\beta$ -thalassemia) จำนวน 6 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบฮีโมโกลบินผิดปกติเช่น ฮีโมโกลบินซี (Hb C) ฮีโมโกลบินดีปันจาบ (Hb D-punjab) ฮีโมโกลบินตาก (Hb Tak) และฮีโมโกลบินโฮป (Hb Hope) ดังแสดงในตารางที่ 1

2. การเปรียบเทียบข้อมูลโลหิตวิทยาของผู้ที่มีและไม่มียีน SAO จำแนกตามธาลัสซีเมียจีโนไทป์

จากตัวอย่างที่มียีน SAO ทั้งหมด 21 ราย พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 20 ราย (ร้อยละ 95) มียีนธาลัสซีเมียหรือยีนฮีโมโกลบินผิดปกติร่วมด้วย และสามารถจำแนกตามธาลัสซีเมียจีโนไทป์ได้ จำนวน 11 จีโนไทป์ ดังตารางที่ 2 ซึ่งธาลัสซีเมียจีโนไทป์ชนิดที่มียีน SAO ร่วมด้วยที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้คือ พาหะฮีโมโกลบินอี จำนวน 8 ตัวอย่าง จึงได้ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงระหว่างกลุ่มพาหะฮีโมโกลบินอี ที่มีและไม่มียีน SAO ร่วมด้วย พบว่าพารามิเตอร์ Rbc (red blood cell) Hb (hemoglobin) และ Hct (hematocrit) ในกลุ่มพาหะฮีโมโกลบินอี ที่มียีน SAO ร่วมด้วยให้ค่าที่มีแนวโน้มต่ำกว่า กลุ่มที่ไม่มียีน SAO แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 2 ในขณะที่ ค่า MCV (mean corpuscular volume) MCH (mean corpuscular hemoglobin) และ RDW (red cell distribution width) ของกลุ่มพาหะฮีโมโกลบินอี ที่มียีน SAO ร่วมด้วยนั้นมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่มียีน SAO ร่วมด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 1 จีโนไทป์ของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในตัวอย่างจำนวน 292 ราย

จีโนไทป์	จำนวน	ร้อยละ
Heterozygous Hb E	107	36.6
Compound heterozygous α^0 -thalassemia (SEA deletion) and Hb CS	23	7.9
Compound heterozygous α^0 -thalassemia (SEA deletion) and α^+ -thalassemia (3.7 kb deletion)	20	6.8
Double heterozygous Hb E with α^+ -thalassemia (3.7 kb deletion)	15	5.1
Heterozygous β^+ -thalassemia (IVSI#5)	13	4.5
Compound heterozygous Hb E with β^+ -thalassemia (IVSI#5)	9	3.1
Hb Tak	9	3.1
Double heterozygous Hb E with α^0 -thalassemia (SEA deletion)	8	2.7
Heterozygous Hb Constant Spring	7	2.4
Homozygous Hb E	7	2.4
Heterozygous β^0 -thalassemia (codon 41/42)	7	2.4
Double heterozygous Hb E with Hb CS	7	2.4
Heterozygous α^0 -thalassemia (SEA deletion)	5	1.7
Compound heterozygous Hb E with β^0 -thalassemia (codon 41/42)	5	1.7
Hb D-punjab	5	1.7
Compound heterozygous Hb E with β^+ -thalassemia (Malay)	5	1.7
Deletion-inversion-insertion (A) $\gamma\delta(\beta)^0$ -thalassemia	5	1.7
Heterozygous β^+ -thalassemia (Malay)	3	1.0
Heterozygous α^+ -thalassemia (3.7 kb deletion)	3	1.0
Compound heterozygous α^0 -thalassemia (SEA deletion) and α^+ -thalassemia (4.2 kb deletion)	3	1.0
Compound heterozygous Hb E with β^0 -thalassemia (codon 17)	3	1.0
Double heterozygous Hb E with α^+ -thalassemia (4.2 kb deletion)	3	1.0
Heterozygous β^0 -thalassemia (3.4 kb deletion)	2	0.7
Heterozygous β^0 -thalassemia (IVSII#654)	2	0.7
Homozygous Hb E with homozygous α^+ -thalassemia (3.7 kb deletion)	2	0.7
Compound heterozygous Hb Tak with β^+ -thalassemia (IVSI#5)	2	0.7
Heterozygous Hb C	2	0.7
Heterozygous Siriraj $\gamma\delta(\beta)^0$ -thalassemia	2	0.7
Heterozygous HPFH-2 (Ghanaian)	2	0.7
Heterozygous β^0 -thalassemia (IVSI#1)	1	0.3
Heterozygous β^0 -thalassemia (codon 17)	1	0.3
Compound heterozygous Hb E with β^0 -thalassemia (Filipino)	1	0.3
Compound heterozygous Hb D-punjab with β^+ -thalassemia (IVSI#5)	1	0.3
Heterozygous Hb Hope	1	0.3
Heterozygous HPFH-6	1	0.3
รวม	292	100

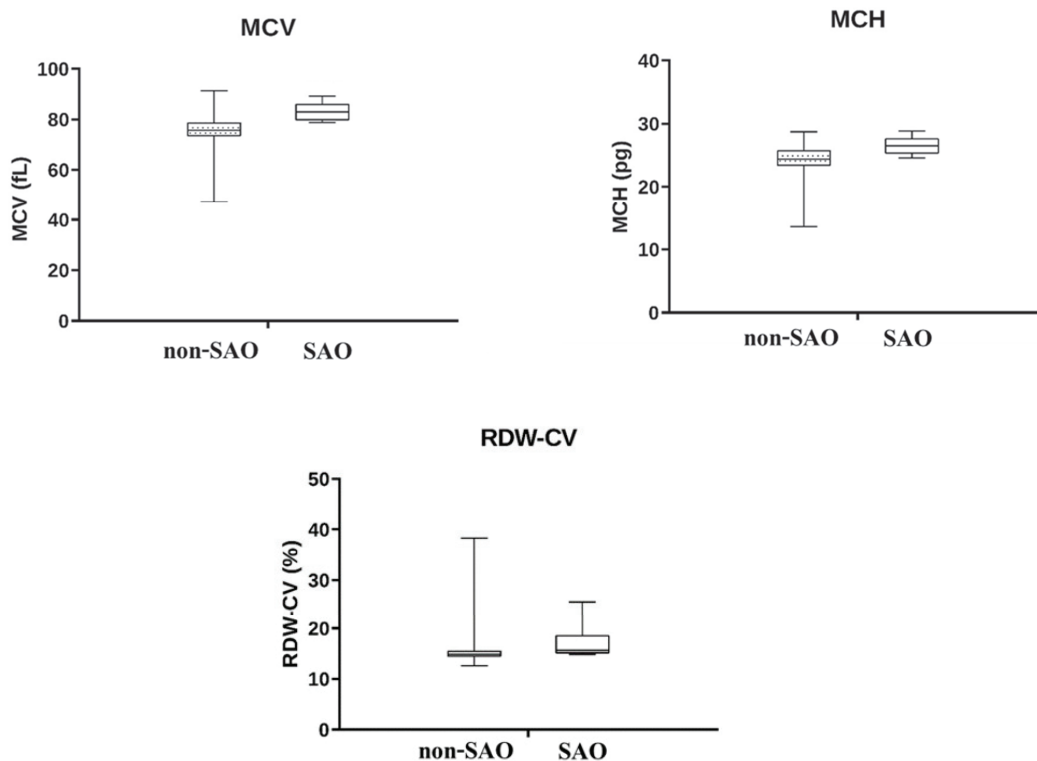
ตารางที่ 2 ข้อมูลการทางโลหิตวิทยา จีโนไทป์ของฮาลัสซีเมีย ในตัวอย่างจำนวน 229 ราย จำแนกตามการมีและไม่มีสาย SAO

ชนิดของฮาลัสซีเมีย	Hb type	SAO	N	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)
Non - thalassemia	A ₂ A	-	33	4.1 $\pm$ 0.9	8.8 $\pm$ 2.4	27.9 $\pm$ 7.0	69.5 $\pm$ 13.1	22.2 $\pm$ 5.3	31.6 $\pm$ 2.0	19.7 $\pm$ 5.3
		+	1	4.8	10.9	33.4	70.1	22.9	32.6	19.8
Heterozygous Hb E	EA	-	99	4.5 $\pm$ 0.6	10.9 $\pm$ 1.7	34.1 $\pm$ 5.1	75.1 $\pm$ 6.7 ^a	24.1 $\pm$ 2.5 ^a	32.1 $\pm$ 1.3	15.9 $\pm$ 3.8 ^a
		+	8	4.0 $\pm$ 0.7	9.8 $\pm$ 2.7	33.7 $\pm$ 6.1	83.1 $\pm$ 3.8	26.5 $\pm$ 1.5	31.9 $\pm$ 2.3	17.2 $\pm$ 4.2
Compound heterozygous α^0 -thalassemia (SEA deletion) and α^+ -thalassemia (3.7 kb deletion)	A ₂ A	-	19	4.65 $\pm$ 0.8	8.43 $\pm$ 1.9	28.4 $\pm$ 5.1	62.3 $\pm$ 5.0	18.5 $\pm$ 1.8	29.6 $\pm$ 1.9	26.2 $\pm$ 7.9
		+	1	5.09	9.4	30.6	60.3	18.5	30.7	15.7
Double heterozygous Hb E with α^+ -thalassemia (3.7 kb deletion)	EA	-	14	4.4 $\pm$ 0.5	10.7 $\pm$ 1.9	33.1 $\pm$ 5.8	75.7 $\pm$ 11.8	24.3 $\pm$ 4.6	32.3 $\pm$ 0.8	17.2 $\pm$ 6.1
		+	1	4.9	13.2	40.5	82.8	26.9	32.5	15.6
Heterozygous β^+ -thalassemia (IVS#5)	A ₂ A	-	12	5.0 $\pm$ 1.4	9.3 $\pm$ 2.7	30.1 $\pm$ 8.6	61.2 $\pm$ 4.7	18.9 $\pm$ 1.7	30.8 $\pm$ 1.5	19.3 $\pm$ 7.2
		+	1	4.93	9.3	30.6	62.1	18.8	30.3	17.1
Hb Tak	A ₂ A with abnormal Hb	-	8	3.4 $\pm$ 2.0	8.5 $\pm$ 4.8	26.2 $\pm$ 14.7	80.2 $\pm$ 17.1	26.5 $\pm$ 7.4	32.6 $\pm$ 2.6	15.1 $\pm$ 3.4
		+	1	3.9	5	20.5	52.7	12.9	24.4	21.7
Homozygous Hb E	EE	-	6	5.4 $\pm$ 0.6	10.6 $\pm$ 1.4	33.0 $\pm$ 4.0	61.5 $\pm$ 2.7	19.7 $\pm$ 1.3	32.1 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 4.6
		+	1	3.5	6.9	22.9	65.6	19.9	30.3	15.8
Heterozygous β^0 -thalassemia (codon 41/42)	A ₂ FA	-	6	4.5 $\pm$ 1.1	9 $\pm$ 2.2	28 $\pm$ 7.0	61.8 $\pm$ 3.9	19.8 $\pm$ 1.0	32.1 $\pm$ 0.8	22.1 $\pm$ 7.7
		+	1	4.59	9.4	30	65.4	20.5	31.4	23.5
Heterozygous Hb Constant Spring	A ₂ A	-	6	4.5 $\pm$ 0.8	10.3 $\pm$ 3.7	32.8 $\pm$ 10	71.5 $\pm$ 13.4	22.1 $\pm$ 5	30.7 $\pm$ 2.4	21 $\pm$ 7.9
		+	1	4.43	10.5	33	74.4	23.8	31.9	17.5
Compound heterozygous Hb E with β^+ -thalassemia (Malay)	EFA	-	4	4.9 $\pm$ 0.4	9 $\pm$ 1.4	28.2 $\pm$ 4.3	57.7 $\pm$ 9.2	18.4 $\pm$ 2.9	32 $\pm$ 1.3	24.7 $\pm$ 11.3
		+	1	5.33	10	33.5	62.8	18.8	30	20.3
Heterozygous α^+ -thalassemia (3.7 kb deletion)	A ₂ A	-	1	4.9	10.1	32.6	66.5	20.6	30.9	17.2
		+	2	3.0, 2.4	5.1, 6.8	18.4, 23.7	61.9, 97.4	17.1, 28.2	27.7, 28.9	28.9, 23
Compound heterozygous Hb E with β^0 -thalassemia (codon 17)	EF(A) ^b	-	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		+	1	1.9	4.7	15.5	81.5	24.5	30	21.7
Hb D-punjab with β^+ -thalassemia (IVS#5)	A ₂ FA with abnormal Hb	-	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		+	1	5	9.4	30.4	61.3	19	31	18.5

^a Significant difference from SAO negative group (Two samples t-test, *p*-value < 0.05)

^b มีประวัติการรับเลือด

nd: No data



รูปที่ 2 Box plot ค่า MCV, MCH และ RDW ในพาหะฮีโมโกลบินอีที่มีและไม่มียีน SAO

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากตัวอย่างที่มียีนธาลัสซีเมียหรือฮีโมโกลบินผิดปกติ จำนวน 292 ตัวอย่างพบว่ามากถึง 20 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการตรวจหา ยีน SAO คิดเป็นร้อยละ 6.8 ซึ่งถือว่ามียีนธาลัสซีเมียและแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้สูงที่จะพบ 2 ภาวะนี้ร่วมกันในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ในโรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ นอกจากนี้ยังพบว่าในจำนวน 20 ตัวอย่างนี้มีภาวะเลือดจาง ซึ่งอาจเนื่องมาจาก SAO และธาลัสซีเมียทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ง่ายกว่าคนปกติ จึงคาดว่าน่าจะพบความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง หรือมีการแตกของเม็ดเลือดแดงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการศึกษาค้นคว้าพบว่าการมีค่า RBC, Hb และ Hct ของกลุ่มพาหะฮีโมโกลบินอีที่มียีน SAO รวมด้วยนั้นให้ค่าที่มีแนวโน้มต่ำกว่า กลุ่มที่ไม่มียีน SAO ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Penman BS และคณะ⁽¹⁹⁾ และเมื่อพิจารณาค่าทางโลหิตวิทยาโดยเปรียบเทียบระหว่าง ผู้ที่มียีน SAO กับไม่มียีน SAO พบว่าผู้ที่ เป็น homozygous Hb E, Heterozygous Hb Tak, และ Heterozygous α^+ -thalassemia มีแนวโน้ม

ที่จะมีภาวะซีดมากกว่าในกลุ่มที่ไม่มียีน SAO ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาในปี 2010 ของ วิชัย เหล่าสมบัติและคณะ⁽²⁰⁾ ที่พบว่าภาวะเลือดจางในเด็กทารกที่มียีน SAO และแม้จะเห็นว่าผู้ที่ เป็นพาหะฮีโมโกลบิน Tak ที่มียีน SAO รวมด้วยมีค่า Hb, HCT, MCV และ MCH ต่ำกว่าผู้ที่ไม่มียีน SAO รวมอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ไม่ทราบประวัติการเจ็บป่วยและการรักษาซึ่งเป็นข้อจำกัดในการศึกษาค้นคว้า จึงสามารถเปรียบเทียบได้เพียงข้อมูลทางโลหิตวิทยา การบ่งบอกความรุนแรงของโรคนั้นจำเป็นต้องอาศัยอาการทางคลินิก ประวัติการรักษามาประเมินความรุนแรงของโรคที่มีและไม่มียีน SAO รวมด้วย

เมื่อพิจารณาค่า MCV, MCH และ RDW ในกลุ่มพาหะฮีโมโกลบินอีที่มียีน SAO จะพบว่ามีความสูงกว่ากลุ่มที่ไม่มียีน SAO รวมด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่ค่า MCV และ MCH ในผู้ที่ เป็นพาหะธาลัสซีเมียที่มียีน SAO รวมมีค่าที่สูงขึ้นนี้อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของธาลัสซีเมียเนื่องจากประเทศไทยมีความชุกของธาลัสซีเมียสูง⁽²¹⁾ และการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียนั้นถือว่ามีความจำเป็น

ซึ่งการตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียในโรงพยาบาลส่วนใหญ่ในประเทศไทยนั้น จะอาศัยค่าพารามิเตอร์ MCV (< 80 fL) หรือการตรวจ OF ร่วมกับ DCIP ในการคัดกรองธาลัสซีเมีย ปิตาธาลัสซีเมียและพาหะฮีโมโกลบินอี⁽²²⁾ การมียีน SAO ร่วมกับการมียีนธาลัสซีเมียนั้น หากทำให้ค่า MCV สูงขึ้นจากที่ควรจะเป็น ซึ่งอาจจะทำให้เกิดผลลบปลอม (false negative) ทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาดได้ การศึกษาผลของ SAO ต่อการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียน่าจะมีประโยชน์ในพื้นที่ที่มีความชุกของ SAO สูง ผลการศึกษาในครั้งนี้บ่งชี้ว่า มีสัดส่วนของผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียที่มียีน SAO ร่วมในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลนราธิวาสราชนครินทร์ในอัตราที่สูงพอสมควร อีกทั้งในการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับอาการทางคลินิกของผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียที่มียีน SAO ร่วม ซึ่งหากแพทย์ผู้รักษาได้ทำการประเมินอาการทางคลินิก ประวัติการรักษา ภาวะแทรกซ้อนในกลุ่มผู้ป่วยที่มีและไม่มียีน SAO นี้ น่าจะทำให้ต้องรู้ค่าความรู้ที่เป็นประโยชน์ในการดูแลรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Liu SC, Palek J, Yi SJ, Nichols PE, Derick LH, Chiou SS, et al. Molecular basis of altered red blood cell membrane properties in Southeast Asian ovalocytosis: role of the mutant band 3 protein in band 3 oligomerization and retention by the membrane skeleton. *Blood* 1995; 86: 349-58.
2. Delaunay J. The molecular basis of red cell membrane disorders. *Blood Rev* 2007; 21(1): 1-20.

3. Jarolim P, Palex J, Amato D, Hassan K, Sapak P, Nurse GT, et al. Deletion in erythrocyte band gene in malaria-resistant Southeast Asian Ovalocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11022-6.
4. Laosombat V. Southeast Asian Ovalocytosis (SAO). *J Hematol Transfus Med* 2006; 1: 7-13.
5. Vasuvattakul S, Yenchitsomanus P, Vachuanichsanong P, Thuwajit P, Kaitwatcharachai C, Laosombat V, et al. Autosomal recessive distal renal tubular acidosis associated with Southeast Asian Ovalocytosis. *Kidney Int* 1999; 56: 1674-82.
6. Nopparatana C, Kanjanaopas S, Saechun V, Matsuo M. Southeast Asian Ovalocytosis (SAO) in the south of Thailand. *PSU-ICMR Symposium*; July 25-26; Songkla, Thailand: 1996.
7. Yusoff NM, Van Rostenberghe H, Shirakawa T, Nishiyama K, Amin N, Darus Z, et al. High prevalence of Southeast Asian ovalocytosis in Malays with distal renal tubular acidosis. *J Hum Genet* 2003; 48: 650-3.
8. Ngouprommin L, Sae-Ung N, Fucharoen S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Jetsrisuparb A. Genetic compound heterozygosity for Southeast Asian Ovalocytosis and thalassemia in Thailand: prevalence and phenotypic analysis. *Clinical Genetics* 2014; 85: 198-200.
9. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndrome. In 4th, editor. Oxford: Blackwell Science. 2001.
10. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. *Hemoglobin* 1987; 65-88.

11. Chen Y, Law HY, Tan GP, Ang AL. Concurrent β -thalassaemia trait and Southeast Asian ovalocytosis associated with clinically significant iron loading. *Blood Cells Mol Dis* 2017; 63: 25-6.
12. Sae-ung N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Alpha (0)-thalassemia and related disorders in northeast Thailand : a molecular and hematological characterization. *Acta Haematol* 2007; 117: 78-82.
13. Boonsa S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Wiangnon S, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. The diverse molecular basis and hematologic features of Hb H and α -thalassemia diseases in northeast Thailand. *Acta Haematol* 2004; 111: 149-54.
14. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Hb Paks [(α 2) codon 142 (TAA->TAT or TAA->Tyr)] in Thai patients with α -thalassemia disease and Hb H disease. *Hemoglobin* 2002; 26: 227-35.
15. Fucharoen S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Pengjam Y. Molecular analysis of a Thai β -thalassaemia heterozygote with normal haemoglobin A₂ level implication for population screening. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 44-9.
16. Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Jetsrisuparb A, Fukumaki Y. A simple non-radioactive assay for hemoglobin E gene in prenatal diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 1994; 229: 197-203.
17. Srivorakun H, Singha K, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. A Large Cohort of Hemoglobin Variants in Thailand: Molecular Epidemiological Study and Diagnostic Consideration. *PLOS ONE* 2014; 9: e108365.
18. Fucharoen G, Fucharoen S, Sanita S, Sanchaisuriya K. Coexistence of Southeast Asian Ovalocytosis and β -Thalassemia: A Molecular and Hematological Analysis. *Am J Hematol* 2007; 82: 381-5.
19. Penman BS, Gupta S, Weatherall DJ. Epistasis and the sensitivity of phenotypic screens for β thalassemia. *Br J Haematol* 2015; 169: 117-28.
20. Laosombat V, Dissaneevate S, Wongchanchailert M, Satayasevana B. Neonatal anemia associated with Southeast Asian Ovalocytosis. *Int J Hematol* 2005; 82: 201-5.
21. Panich V, Pornpatkul M, Sriroongrueng W. The problem of thalassemia in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992; 23: 1-6.
22. Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Sae-ung N, Dangwibul S, Fucharoen S. A simplified screening strategy for thalassaemia and hemoglobin E in rural communities in south-east Asia. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 364-72.