

การตรวจวินิจฉัยการขาดหายของยีนอัลฟาโกลบินที่พบได้บ่อย 7 ชนิด ด้วยวิธี Multiplex GAP PCR ในงานบริการประจำ

วารกรณ์ กลมเกลลา, วิภากรณ์ อุทโท, วิไลวรรณ จันทรสิงห์, ปาริฉัตร พิงอัมฤทธิ์,
วรุณี จินช้าง, วิพร วิประกษิต

บทคัดย่อ

อัลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคพันธุกรรมซึ่งพบมากที่สุดในประเทศไทยส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายของยีนอัลฟาโกลบินที่สำคัญมี 2 ชนิดคือ อัลฟาธาลัสซีเมีย 2 หรือ α^0 ธาลัสซีเมียและอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 หรือ α^+ ธาลัสซีเมีย ผู้ที่เป็นพาหะจะไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ สำหรับคนที่ เป็นโรคจะมีอาการความรุนแรงแตกต่างกันไปตั้งแต่ อาการน้อยมากปานกลาง และรุนแรงมากที่สุดคือตายตั้งแต่แรกเกิด เรียกว่า ฮีโมโกลบินบาร์ท ไฮโดรอป ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยการขาดหายของยีนอัลฟาโกลบินโดยวิธีทางอณูชีววิทยามีอยู่หลายวิธีด้วยกันเช่น วิธี Southern analysis เป็นต้น ในรายงานนี้ได้เสนอการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี Multiplex GAP PCR ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถตรวจวินิจฉัยการขาดหายของสายยีนอัลฟาโกลบินได้อย่างครอบคลุมถึง 7 ชนิด ของความผิดปกติทั้ง α^0 และ α^+ ธาลัสซีเมียในคราวเดียวกันคือ $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{SEA}$, $--^{THAI}$, $-\alpha^{20.5}$, $--^{FIL}$ และ $--^{MED}$ การตรวจวินิจฉัยวิธีนี้จะบอกผลได้แม่นยำรวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน ผลการศึกษาในตัวอย่างตรวจจำนวน 377 ราย ซึ่งได้รับการตรวจพื้นฐานทางโลหิตวิทยา Complete Blood Count (CBC) และ Red Blood Cell indices ตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง Hb Gold-Low Pressure Liquid Chromatography (LPLC) และตรวจวินิจฉัยอัลฟาธาลัสซีเมีย โดยวิธี Multiplex GAP PCR พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มียีนอัลฟาโกลบินปกติ จำนวน 210 ตัวอย่าง (55.7%) พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 81 ตัวอย่าง (21.5 %) พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 จำนวน 54 ตัวอย่าง (14.3 %) เป็นโรคอัลฟาธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินเอช จำนวน 27 ตัวอย่าง (7.2 %) และโฮโมไซกัสอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 จำนวน 5 ตัวอย่าง (1.3 %) ตามลำดับ คณะผู้วิจัยจะได้นำเสนอข้อมูลทางโลหิตวิทยาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มจีโนไทป์ชนิดต่างๆ เหล่านี้ต่อไป

บทนำ

อัลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมถ่ายทอดแบบ Autosomal recessive พบมากในประชากรไทยและพบได้ทั่วโลก ความชุกของอัลฟาธาลัสซีเมียในประเทศไทยมี 5.5-30.7 เปอร์เซนต์⁽¹⁻⁴⁾ ส่วนใหญ่เป็นความผิดปกติจากการขาดหายของยีนอัลฟาโกลบินและส่วนน้อยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส (point mutation)

อัลฟาธาลัสซีเมียที่สำคัญมีอยู่ 2 ชนิด คือ อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 หรือ α^+ ธาลัสซีเมีย เกิดจากการขาดหายของยีนอัลฟาโกลบินทั้งสองที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกัน ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์สายอัลฟาโกลบินบนโครโมโซมข้างนั้นเลย ขณะที่อัลฟาธาลัสซีเมีย 2 หรือ α^0 ธาลัสซีเมีย จะมีการสังเคราะห์สายอัลฟาโกลบินได้ในปริมาณที่น้อย

สาขาวิชาโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โทรศัพท์ 02 419-7000 ต่อ 5971-3 โทรสาร 02 866-3021 E mail: sivvp@mahidol.ac.th

Application of the Multiplex GAP Polymerase Chain Reaction (PCR) Analysis for 7 Common Deletional α -Thalassemias Detection in Routine Laboratory Service

Waraporn Glomglao, Wiyakan Utto, Wilaiwan Chansing, Parichat Pungamritt, Worrawut Chinchang, Vip Viprakasit

Alpha thalassemias is the most common genetic disease found in Thailand. The major cause of α -thalassemias are deletions which remove either single or both linked α globin genes namely α^+ and α^0 respectively. Heterozygotes for α thalassemia are clinically silent. In general, α thalassemic patients with compound heterozygotes for α^0 and α^+ thalassemia resulting in Hb H disease have mild to moderate anemia and require transfusion infrequently. The most severe form is Hb Bart's hydrops in which the affected fetus die in utero or soon after birth due to homozygous of α^0 thalassemia.

Several molecular techniques could be used to detect α thalassemia including conventional Southern analysis. In our laboratory, we developed an in house Multiplex GAP PCR analysis for simultaneously detecting seven common α^0 and α^+ thalassemia deletions. These include $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{SEA}$, $--^{THAI}$, $-\alpha^{20.5}$, $--^{FIL}$ and $--^{MED}$. This technique could detect heterozygotes homozygotes and compound heterozygotes for these deletions in a single reaction with high efficiency and less labour intensive compared to conventional technique. We applied this technique in 377 samples in our routine diagnostic service. The genotype identified were $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ in 210 (55.7%), $--/\alpha\alpha$ in 81 (21.5%), $-\alpha/\alpha\alpha$ in 54 (14.3%), $--/-\alpha$ (Hb H disease) in 27 (7.2%) and $-\alpha/-\alpha$ in 5 (1.3%) cases respectively. Hematological parameters and hemoglobin data among these genotypic groups were compared and presented.

Key words : Multiplex gap PCR, α -thalassemia, deletion, genotype

กว่าปกติ อัลฟาธาลัสซีเมีย 2 แบ่งออกตามตำแหน่ง และขนาดของยีนที่ขาดหาย ที่พบบ่อยมี 2 ชนิด คือ ชนิด ที่มีดีเอ็นเอขาดหายไป 3.7 กิโลเบส เรียกว่า rightward deletion ส่วนชนิดที่มีดีเอ็นเอขาดหายไป 4.2 กิโลเบส เรียกว่า leftward deletion ยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 ในประชากรไทยจะพบยีนขาดหายชนิด 3.7 กิโลเบส มากกว่า 4.2 กิโลเบส⁽⁵⁾ ผู้เป็นพาหะจะไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ สำหรับคนที่ เป็นโรคจะมีอาการรุนแรงแตกต่าง

กันไปตั้งแต่อาการน้อยมาก ปานกลาง และรุนแรงมากที่สุดคือตายตั้งแต่แรกเกิด

การตรวจวินิจฉัยอัลฟาธาลัสซีเมียโดยเฉพาะภาวะที่เป็นพาหะจะทำการตรวจวินิจฉัยได้ยาก เนื่องจากไม่มีอาการความผิดปกติใดๆ ปรากฏให้เห็นโดยเฉพาะอย่างยิ่งพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 จะมีชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน รวมถึงขนาดของเม็ดเลือดแดงใกล้เคียงกับคนปกติทั่วไป ส่วนกรณีของพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1

Hematology-Oncology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University

ส่วนใหญ่จะมีขนาดเม็ดเลือดแดง (MCV) จะเล็กกว่าคนปกติชัดเจน แต่ก็ยังไม่สามารถแยกได้จากผู้ที่มีการติดเชื้อจากการขาดธาตุเหล็ก⁽⁶⁾ ปัจจุบันวิธีทางอณูชีววิทยามีบทบาทมากในการใช้วินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ทำให้สามารถบอกความเป็นพาหะได้อย่างแม่นยำ แต่การตรวจทางอณูชีววิทยาก็มีหลายหลากวิธีด้วยกัน เช่น วิธี DNA mapping จะใช้เวลาในการทำงานและยุ่งยากไม่สะดวกรวดเร็ว วิธี GAP PCR ก็เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ตรวจการขาดหายของ DNA ได้ดีและรวดเร็ว⁽⁷⁾ แต่หาความผิดปกติได้ครั้งละชนิดเดียว ดังนั้นผลงานที่น่าเสนอนี้ได้ดัดแปลงนำเอาวิธีการของ GAP-PCR มาพัฒนาเพื่อให้สามารถตรวจความผิดปกติของการขาดหายของอัลฟาโกลบินยีนได้ถึง 7 ชนิดในคราวเดียวกัน คือ ชนิด Southeast Asian, Thai, 3.7 kb, 4.2 kb, 20.5 kb, Philipino และ Mediteranian ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย เพื่อนบ้านและประชากรในประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนเรียก วิธีการตรวจแบบนี้เรียกว่า Multiplex GAP-PCR⁽⁸⁾ รายงานนี้จะได้นำเสนอผลจากการนำเทคนิคดังกล่าวมาปรับใช้ในงานบริการประจำวันในห้องปฏิบัติการทางโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช

วิธีการศึกษา

จาก 377 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่างที่ได้จากผู้ที่มาเข้ารับบริการการตรวจวินิจฉัยหาภาวะ ธาลัสซีเมียที่สาขาวิชาโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ตั้งแต่วันที่ 20 กันยายน 2547-2 กุมภาพันธ์ 2549 ทุกตัวอย่างได้ทำการตรวจวิเคราะห์ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การตรวจวิเคราะห์ขั้นพื้นฐานทางโลหิตวิทยา (complete blood count) ทำการตรวจโดยใช้เครื่องตรวจ

วิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ ยี่ห้อ Coulter Counter รุ่น AcT. 5 diff.

2. การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี Low Pressure Liquid Chromatography (LPLC) ด้วยเครื่อง Hb Gold ของบริษัท Drew

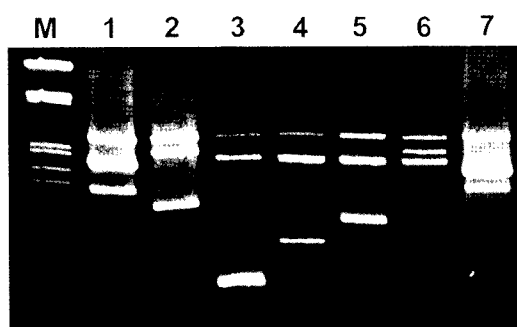
3. นำตัวอย่างที่ทำการศึกษามาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีมาตรฐาน Phenol-chloroform และใช้enzyme proteinase K เพื่อช่วยย่อยโปรตีนและเปลือกของเม็ดเลือดแดง

4. นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตรวจวินิจฉัยการขาดหายของยีนอัลฟาโกลบินด้วยวิธี Multiplex GAP PCR ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยาสำหรับปริมาณ 50 ไมโครลิตรคือ 200 μ M ของ dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 1XQ-solution (Qiagen,Hilden,Germany), 2.5 U HotStar Taq DNA polymerase, 100-200 ng DNA และ 16 คู่ ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน (ดูจากตารางที่ 1) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในเครื่องพีซีอาร์ยี่ห้อ MJ Research รุ่น PTC -220 DNA Engine Dyad^R Cyclor โดยมีขั้นตอนแรกคือการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 45 วินาที ขั้นตอนในการจับของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลานาน 45 วินาทีและขั้นตอนสุดท้ายคือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (primer extention) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 135 วินาที ทำปฏิกิริยาจากขั้นตอนแรกถึงขั้นตอนสุดท้ายซ้ำ 30 รอบนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปทำ Electrophoresis ใน 1 % Agarose ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 35 นาที และย้อมด้วยสี Ethidium bromide และดูผลด้วย UV Transiluminator ดังรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยการขาดหายของยีนอัลฟาโกลบิน(ดัดแปลงจาก Tan AS et. al, Blood. 2001 Jul 1; 98 (1): 250-1.)

Name	5'→3' sequence	ความเข้มข้น	Amplicon (size)
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATTTGAGC	0.5 μ M	Lis1 3'UTR fragment (2350bp)
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	0.5 μ M	
α 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.2 μ M	$-\mu^{3.7}$ jxn fragment (2022/2029 bp)
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0.2 μ M	
α 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.2 μ M	μ^2 gene (1800bp)
α 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0.2 μ M	
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0.5 μ M	$-\mu^{4.2}$ jxn fragment (1628 bp)
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	0.5 μ M	
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	0.2 μ M	-- ^{SEA} jxn fragment (1349 bp)
SEA-R	AGCCACGTTGTGTTTCATGGC	0.2 μ M	
THAI-F	GACCATTCCTCAGCGTGGGTG	0.3 μ M	-- ^{THAI} jxn fragment (1153 bp)
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	0.3 μ M	
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	0.2 μ M	$-(\alpha)^{20.5}$ jxn fragment (1007 bp)
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0.2 μ M	
MED-F	TACCCCTTGCAAGCACACGTAC	0.2 μ M	-- ^{MED} jxn fragment (807 bp)
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	0.2 μ M	
FIL-F	TTTAAATGGGCAAAACAGGCCAGG	1.0 μ M	-- ^{FIL} jxn fragment (546 bp)
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	1.0 μ M	

Jxn = Junction.



รูปที่ 1 : แสดงผลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ Multiplex gap PCR ในกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ดังต่อไปนี้

แถวที่ 1 --^{SEA}/ $\alpha\alpha$
 แถวที่ 2 --^{THAI}/ $-\alpha^{3.7}$
 แถวที่ 3 --^{FIL}/ $\alpha\alpha$
 แถวที่ 4 --^{MED}/ $\alpha\alpha$
 แถวที่ 5 $-(\alpha)^{20.5}$ / $\alpha\alpha$

แถวที่ 6 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$

แถวที่ 7 $-\alpha^{4.2}/--^{\text{SEA}}$

M = Marker DNA Lambda ตัดด้วยเอ็นไซม์ Hind III และ EcoRI

การแปลผลจีโนไทป์ทำโดยดูจากขนาดของ PCR product ที่ได้ดังนี้

External gene control = 2350 bp
 (LIS 1 gene 3'UTR fragment)
 Normal gene ($\alpha\alpha$) = 1800 bp
 fragment ($\alpha\alpha$)
 --^{SEA} junction fragment (--^{SEA}) = 1349 bp
 --^{THAI} junction fragment (--^{THAI}) = 1153 bp
 --^{FIL} junction fragment (--^{FIL}) = 546 bp
 --^{MED} junction fragment (--^{MED}) = 807 bp
 $-(\alpha)^{20.5}$ junction fragment ($-(\alpha)^{20.5}$) = 1007 bp
 $-\alpha^{3.7}$ junction fragment ($-\alpha^{3.7}$) = 2022 bp
 $-\alpha^{4.2}$ junction fragment ($-\alpha^{4.2}$) = 1628 bp

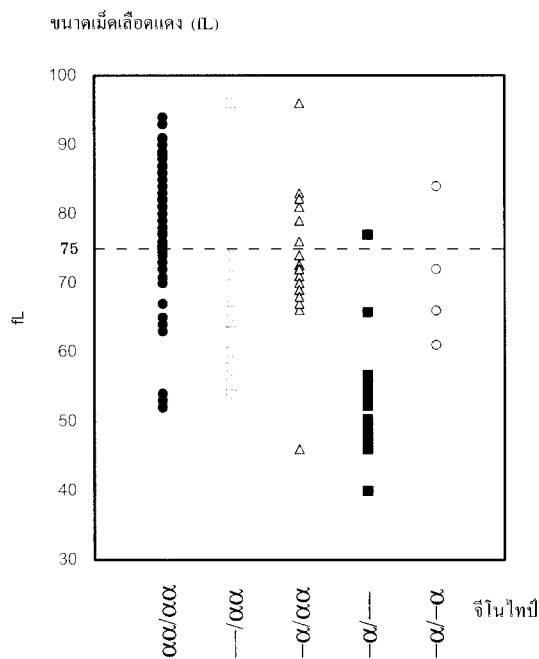
ตารางที่ 2 สรุปผลการตรวจจีโนไทป์ (genotypes) ของ ยีนอัลฟาโกลบินด้วยวิธี Multiplex GAP PCR ในกลุ่ม ตัวอย่างจำนวน 377 ราย

จีโนไทป์	จำนวน	ร้อยละ
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	210	55.7
$\alpha\alpha/--^{SEA}$	81	21.5
$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$	49	13.0
$\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$	5	1.3
$-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$	25	6.6
$-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$	1	0.3
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	3	0.8
$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$	2	0.5
$-\alpha^{3.7}/--^{THAI}$	1	0.3
รวม	377	100

ผลการศึกษา

จากการตรวจวิเคราะห์การขาดหายของยีนอัลฟาโกลบิน 7 ชนิด ด้วยวิธี Multiplex GAP PCR จำนวน 377 ตัวอย่างมีผลการตรวจดังตารางที่ 2 ซึ่งสามารถจัดกลุ่ม จีโนไทป์ของยีนอัลฟาโกลบินที่ได้รับการตรวจวินิจฉัย การ ขาดหายของยีนอัลฟาโกลบินด้วยวิธี Multiplex GAP PCR ได้ 9 แบบด้วยกันคือ กลุ่มที่มียีนอัลฟาโกลบินปกติ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ($\alpha\alpha/--^{SEA}$), พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$, ($\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$), อัลฟาธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินเอช ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$, $--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$, และ $--^{THAI}/-\alpha^{3.7}$) และโฮโมไซกัสอัลฟาธาลัส ซีเมีย 2 ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$) ในตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน ในกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ของยีนอัลฟาโกลบินปกติและ พาหะของยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย และในตารางที่ 4 แสดง

ค่าทางสถิติของค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง แยกตามจีโนไทป์ ของยีนอัลฟาโกลบินจากกลุ่มตัวอย่างในตารางที่ 3 ที่มีผลการตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินเป็น ปกติ (Hb A และ $A_2 \leq 3.5$) โดยใช้โปรแกรม Excel ในการคำนวณซึ่งพบว่าในกลุ่มที่เป็นพาหะของอัลฟา ธาลัสซีเมีย 1 เกือบทุกรายจะมีขนาดของเม็ดเลือดแดง เล็กกว่า 75 เฟมโตลิตร แต่ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มที่ เป็นโฮโมไซกัสอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 และรูปที่ 2 เป็นการ แสดงความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยขนาดของเม็ดเลือดแดง (MCV) กับกลุ่มจีโนไทป์แบบต่างๆ ของยีนอัลฟาโกลบิน ซึ่งสามารถนำมาปรับใช้เป็นค่ามาตรฐานในการตรวจกรองหา ความผิดปกติจากเม็ดเลือดแดงต่อไปในอนาคต



รูปที่ 2 : ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยขนาดของเม็ดเลือดแดง (MCV) กับจีโนไทป์ของยีนอัลฟาโกลบิน

ตารางที่ 3 แสดงผลการวินิจฉัยภาวะธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในกลุ่มตัวอย่างด้วยการตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินด้วยวิธี LPLC เปรียบเทียบกับจีโนไทป์ของยีนอัลฟาโกลบินปกติและพาหะของยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย

จีโนไทป์ (จำนวน)	การตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินด้วยวิธี LPLC						
	A ₂ ปกติ (A ₂ ≤ 3.5)	พาหะของ เบต้าธาลัสซีเมีย (A > 3.5)	พาหะของ ฮีโมโกลบิน อี (Hb E)	โฮโมไซ กัสฮีโมโกลบิน อี (Hb EE)	โรค เบต้าธาลัสซีเมีย ชนิดฮีโมโกลบินอี (β Thal/ Hb E)	ฮีโมโกลบิน คอนส- แตนท์ สปริง (Hb CS)	ภาวะ ฮีโม โกลบิน ผิดปกติ อื่นๆ
αα/αα (210)	85	23	41	11	22	18	10*
αα/-- ^{SEA} (81)	33	1	10	2	-	33	2**
αα/-α ^{3.7} (49)	20	1	17	7	1	2	1***
αα/-α ^{4.2} (5)	3	-	-	1	-	1	-
รวม	141	25	68	21	23	54	13

หมายเหตุ * 5 ตัวอย่างที่เป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียและ 4 ตัวอย่างเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ (ฮีโมโกลบินตกและธนูรี)
 ** 1 ตัวอย่างเป็นโรค hydrops fetalis และอีก 1 ตัวอย่างเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ
 *** 1 ตัวอย่าง ยังหาสาเหตุอยู่

วิจารณ์และสรุปผล

การตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย ทั้งอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 และอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 มีความสำคัญเนื่องจากพาหะทั้ง 2 ชนิดสามารถทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดที่รุนแรงที่สุดคือ Hb Bart's Hydrops fetalis ที่เด็กจะตายแต่แรกคลอดและพวกที่มีอาการรุนแรงน้อยได้แก่โรคธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินเอชซึ่งเกิดจากปฏิสัมพันธ์กันระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 กับอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 หรือพวกที่ไม่มีอาการเลยคือโฮโมไซกัสอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 ในกลุ่ม

ที่เป็นโรคนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยได้ไม่ยากด้วยวิธีมาตรฐานธรรมดา แต่ในกลุ่มที่เป็นพาหะนั้นไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้แม่นยำโดยเฉพาะอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 ซึ่งผลตรวจด้วยวิธีมาตรฐานจะเหมือนคนปกติเกือบทุกอย่าง ส่วนในพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 แม้ค่า MCV จะต่างจากคนปกติมากแต่ก็ไม่สามารถแยกได้จากคนปกติที่มีภาวะของการขาดธาตุเหล็ก ดังนั้นเมื่อการตรวจโดยวิธีทางอณูชีววิทยาจะสามารถทำให้การตรวจวินิจฉัยการขาดหายของยีนอัลฟาธาลัสซีเมียแม่นยำยิ่งขึ้นและใช้

ตารางที่ 4 แสดงค่าผลการตรวจค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงประเภทต่าง ๆ แยกตามจีโนไทป์ของยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย เฉพาะในรายที่มีผลตรวจชนิดฮีโมโกลบินเป็นปกติ (Hb A และ A2 $\leq 3.5\%$)

จีโนไทป์	ค่าพารามิเตอร์	Hb	Hct	Rbc	MCV	MCH	MCHC	RDW
จำนวน		(g/dl)	(%)	($\times 10^6\text{-mm}^3$)	(fL)	(pg)	(g/dl)	(%)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (85)	Mean $\pm$ SD	12.31 $\pm$ 2.60	36.19 $\pm$ 7.49	4.56 $\pm$ 0.82	79.43 $\pm$ 9.56	27.07 $\pm$ 3.76	33.89 $\pm$ 1.99	16.14 $\pm$ 13.90
	Median	12.7	37.20	4.67	81.10	28.20	34.00	13.40
	Min:Max	3.8-17.0	11.5-49.2	1.47-6.25	47-94	13.8-32.7	23.4-40.0	10.8-29.8
$\alpha\alpha/-$ (33)	Mean $\pm$ SD	11.80 $\pm$ 1.07	36.93 $\pm$ 3.40	5.76(0.50)	64.51 $\pm$ 7.92	20.64 $\pm$ 2.77	31.97 $\pm$ 0.96	16.04 $\pm$ 2.07
	Median	11.8	36.75	5.75	64.6	520.6	31.85	15.25
	Min:Max	10.2-15.3	31.6-46.2	4.83-7.05	50-96	14.8-31.8	29.5-34.5	11.9-20.8
$\alpha\alpha/-\alpha$ (23)	Mean $\pm$ SD	12.00 $\pm$ 2.20	36.05 $\pm$ 6.17	4.85 $\pm$ 0.61	74.34 $\pm$ 9.20	24.76 $\pm$ 3.66	33.21 $\pm$ 1.62	19.08(21.8)
	Median	12.45	37.4	4.87	74	24.7	33.15	13.5
	Min:Max	6.6-15.3	20.1-46.1	2.99-5.59	46.0-96.0	13.0-32.7	28.3-37.0	10.7-26.9
$-\alpha/-$ (27)	Mean (SD	9.13 $\pm$ 1.32	28.86 $\pm$ 4.87	5.48 $\pm$ 0.84	52.75 $\pm$ 6.81	16.81 $\pm$ 2.41	32.04 $\pm$ 3.20	23.87 $\pm$ 5.31
	Median	9.3	29.4	5.57	53	16.35	31.6	22.7
	Min:Max	5.0-12.7	11.4-36.6	2.84-7.29	40.0-77.0	14.1-26.9	26.4-43.9	12.7-35.7
$-\alpha/-\alpha$ (4)	Mean (SD	11.3 $\pm$ 0.37	34.9 $\pm$ 1.95	4.89 $\pm$ 1.03	70.75 $\pm$ 9.91	22.95 $\pm$ 3.99	32.45 $\pm$ 1.51	15.92 $\pm$ 3.96
	Median	11.4	35.9	5.44	66	20.9	31.6	16.4
	Min:Max	10.8-11.7	32.4-36.9	3.88-6.07	61.0-84.0	18.7-27.8	30.8-34.1	12.3-21.3

อธิบายคำย่อ : Hb = hemoglobin
Hct = hematocrit
Rbc = red blood cell
MCV = mean corpuscular volume
MCH = mean corpuscular hemoglobin
MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration
RDW = red cell distribution width

เวลาในการตรวจน้อยลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจ โดยวิธี Multiplex GAP PCR ที่รายงานในการศึกษา ครั้งนี้สามารถตรวจหาความผิดปกติพร้อมๆกันได้ถึง 7 ชนิดทำให้ประหยัดเวลาและแรงงานคนในการตรวจส่งตรวจในเวลาเดียวกัน จากตารางเปรียบเทียบ ระหว่างจีโนไทป์กับวิธี LPLC จะเห็นว่าการตรวจ จีโนไทป์สามารถบอกความเป็นพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมียได้หมดทุกประเภทซึ่งวิธี LPLC ไม่สามารถตรวจ

พบได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 ซึ่งจะมีขนาดเม็ดเลือดแดง (MCV) ใกล้เคียงกับปกติ นอกจากนั้นการตรวจจีโนไทป์ยังสามารถวินิจฉัยแยก ระหว่างพาหะ อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 กับโฮโมไซ กัสอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 ได้อย่างชัดเจน ซึ่งวิธีมาตรฐาน ธรรมดาไม่สามารถแยกได้เนื่องจากในทั้ง 2 กลุ่มจะมี เม็ดเลือดแดงที่มีขนาดเล็กไม่แตกต่างกัน การตรวจดี เอ็นเอด้วยเทคนิคดังกล่าว สามารถนำมาใช้ในการตรวจ

วินิจฉัยก่อนคลอดซึ่งสามารถ ทำได้รวดเร็ว แม่นยำ ป้องกันการมีบุตรที่มีโรคธาลัสซีเมีย ชนิดร้ายแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสรุปวิธีการดังกล่าวนี้สามารถนำไปปรับใช้ได้ในห้องปฏิบัติการที่ทำงานบริการประจำวันได้ โดยไม่มีปัญหาและอุปสรรคแต่อย่างใด และสมควรได้รับการส่งเสริมให้ห้องปฏิบัติการต่างๆ พัฒนาและเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจหาพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมียดังกล่าวให้แพร่หลายซึ่งจะส่งผลดีต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของโครงการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียในระดับประเทศต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศ. เกียรติคุณ พญ. วรพรรณ ตันไพจิตร อดีตหัวหน้าสาขาวิชาโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และผู้ร่วมงานในสาขาวิชาทุกท่านที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนในการทำการศึกษานี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากทุนพัฒนาการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลแก่ ผศ.ดร.นพ.วิปร วิประภิต

เอกสารอ้างอิง

1. Na-Nakorn S, Wasi P. Alpha-thalassemia in northern Thailand. *Am J Hum Genet* 1970; 30: 635-641.
2. Pootrakul S, Wasi P, Pornpatkul M, Na-Nakorn S. The incidence of alpha-thalassemia in Bangkok. *J Med Assoc Thai* 1970; 53: 250-264.
3. Laosombut V, Panich V, Surapruk P, Pornpatkul M. Alpha-thalassemia in southern Thailand. Abstract of 3rd Asian Congr Ped, November 1979, Bangkok, Thailand, p 71.
4. Saichua S, Sathiropas P, Rompruk A. Prevalence of thalassemia in Srinagarind Hospital. *J Med Tech Assoc Thai* 1983; 11: 7-11.
5. Winichagoon P, Fucharoen S, Wasi P. The molecular basis of alpha-thalassemia in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992; 23 Suppl 2: 7-13.
6. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.
7. Winichagoon P, Fucharoen S, Kanokpongsakdi S, Fukumaki Y. Detection of α -thalassemia-1 (Southeast Asian type) and its application for prenatal diagnosis. *Clin Genet* 1995; 47: 318-320.
8. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7- deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α -thalassemia. *Blood* 2001; 98: 250-251.