

การตรวจหาพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion ในงานประจำวัน อย่างมีประสิทธิภาพ

สนทอง พรพันธุ์กุล^{1,2}, สุพรรณ พุเจริญ^{2*}, กุลนภา พุเจริญ², ณัฐยา แซ่ฮึง², กนกวรรณ แสนไชยสุริยา²

บทคัดย่อ

เพื่อให้การตรวจหาผู้ที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่เป็นไปได้อย่างรวดเร็ว จึงได้ศึกษาแนวทางการใช้ผลการตรวจกรองเบื้องต้นร่วมกับการตรวจหาอินอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion ด้วยวิธี real-time PCR ทำการศึกษาในผู้ใหญ่ที่เข้ามาขอรับบริการการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียในงานประจำวันที่หน่วยบริการธาลัสซีเมีย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตัวอย่างทุกรายได้รับการตรวจคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธี modified one tube osmotic fragility test (OF test) และตรวจหาดัชนีเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบ OF test เป็นบวก หรือมีค่า MCV น้อยกว่า 80 เฟมโตลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี HPLC และตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาอินอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion โดยวิธี PCR 2 แบบ คือ conventional GAP-PCR ซึ่งใช้อยู่ในงานประจำวัน และวิธี real-time PCR โดยใช้ SyBr green I เป็นสารเรืองแสง ร่วมกับการวิเคราะห์ melt curve ซึ่งให้ specific peak สำหรับ SEA deletion ที่มีค่า T_m เท่ากับ $86 \pm 1^\circ$ เซลเซียส ผลการศึกษาในตัวอย่างจำนวน 98 ราย ที่ให้ผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้นเป็นบวก ตรวจพบอินอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion จำนวน 22 ราย (ร้อยละ 22.5) โดยวิธี PCR ทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจตรงกันทุกราย ประกอบด้วยผู้ที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 14 ราย ผู้ที่เป็นโรคฮีโมโกลบินเอช 3 ราย และพาหะฮีโมโกลบินอีร่วมกับพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 5 ราย ตัวอย่างที่เหลือ 76 รายตรวจไม่พบ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ OF test หรือ MCV ร่วมกับการทำ real-time PCR และการวิเคราะห์ melt curve ในการตรวจหาผู้ที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในงานประจำวันที่มีตัวอย่างตรวจจำนวนมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ธาลัสซีเมีย, อัลฟาธาลัสซีเมีย 1, การตรวจคัดกรอง, real-time PCR

¹ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Effective routine screening for α - thalassemia 1 carrier with the SEA deletion

Sontong Pornphannukool^{1,2}, Supan Fucharoen^{2*}, Goonnapa Fucharoen²,
Nattaya Sae-ung², Kanokwan Sanchaisuriya²

Abstract

In order to provide rapid method for identifying α - thalassemia 1 in massive screening, we have tested a simple screening strategy using simple blood test and real-time PCR. Study was done at our ongoing thalassemia screening at the Thalassemia Service Unit, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University. Initial screening was done for all samples using a modified one tube osmotic fragility test (OF test) and Rbc indices obtained using standard blood cell counter. Those who had positive OF test results or MCV less than 80 fl were subjected to further PCR analysis for detection of α - thalassemia 1 (SEA deletion) by two PCR methods. In the first method, α - thalassemia 1 determinant was identified using a conventional GAP-PCR routinely run in our laboratory. In the second method, identification of α - thalassemia 1 (SEA) was carried out using a real-time PCR with SyBr green I and melt curve analysis. The SEA determinant generated specific melt curve with Tm of $86 \pm 1^\circ$ C. Among 98 subjects who were positive at the initial screening, α - thalassemia 1 (SEA deletion) was detected in 22 (22.5 %) of them by both PCR methods. These included 14 α - thalassemia 1 carriers, 3 patients with Hb H disease and 5 subjects with double heterozygote for α - thalassemia 1 and Hb E. No α - thalassemia 1 was detected in the remaining 76 cases. This data demonstrates that identification of α - thalassemia 1 in routine practice with large number of samples can be effectively done using a combination of OF test or MCV and a real-time PCR which should prove useful in a prevention and control program of thalassemia in area with high prevalence.

Keywords: Thalassemia, α -thalassemia 1, Screening test, Real-time PCR

¹ Medical Science Program, Graduate School, Khon Kaen University,

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

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

บทนำ

อัลฟาธาลัสซีเมีย (α -thalassemia) เป็นความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมเกิดจากการขาดหายไปของยีนอัลฟาโกลบิน (α -globin gene) พบได้บ่อยในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และจีน ในประเทศไทยมีความถี่ของการพบยีนอัลฟาธาลัสซีเมียประมาณร้อยละ 20-30^(1,2) อัลฟาธาลัสซีเมีย แบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ อัลฟาธาลัสซีเมียหรืออัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α^0 -thalassemia หรือ α - thalassemia 1) และ อัลฟาบวธาลัสซีเมียหรืออัลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α - thalassemia 2)⁽³⁾ โดยทั่วไปถือว่า อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 เป็นอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ส่วนอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 เป็นชนิดไม่รุนแรง ผู้ที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ส่วนใหญ่มีสุขภาพดีและไม่แสดงอาการใดๆ แต่อาจมีภาวะ hypochromic microcytosis ได้อย่างไรก็ตามปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิดโฮโมไซกัสทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอปส์ฟิทัลิส (Hb Bart's hydrops fetalis) ซึ่งทำให้ทารกมีอาการชืดบวม ตับม้ามโตและรกใหญ่มาก ทารกจะเสียชีวิตตั้งแต่ในระยะก่อนคลอดหรือภายหลังคลอดได้ไม่นานนัก การตั้งครรภ์ทารกดังกล่าวยังส่งผลกระทบต่อมารดา ระหว่างตั้งครรภ์ด้วย มีโอกาสสูงที่จะเกิดภาวะครรภ์เป็นพิษ ความดันสูง บวม การคลอดผิดปกติและเกิดอาการตกเลือดหลังคลอดได้⁽⁴⁾ จัดเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงชนิดหนึ่งที่เป็นเป้าหมายหลักของการดำเนินงานในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียของประเทศไทย⁽⁵⁾ นอกจากนี้ปฏิสัมพันธ์ของยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 และอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 ยังทำให้เกิดเป็นโรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) ซึ่งก่อให้เกิดอาการทางคลินิกได้และพบได้บ่อยในคนไทย ปฏิสัมพันธ์ของ Hb H ร่วมกับ Hb E ก่อให้เกิดโรค EABart's และ EFBart's ซึ่งพบได้บ่อยในคนไทยโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ^(6,7) การตรวจวินิจฉัยคู่สมรสที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก ปัจจุบันวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ให้ผลแน่นอนที่สุดคือการตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลด้วยวิธี

PCR ข้อมูลจากการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่าความผิดปกติที่ทำให้เกิดอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในคนไทยส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไปของดีเอ็นเอชนิด SEA deletion มีส่วนน้อยที่เกิดจากความผิดปกติชนิด THAI deletion^(8,9) ข้อมูลจากการศึกษาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าอัตราการตรวจพบอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด THAI deletion มีเพียงประมาณ 1 ใน 400 ของชนิด SEA deletion⁽¹⁰⁾

การดำเนินงานที่นิยมใช้ในปัจจุบันเริ่มด้วยการตรวจคัดกรองด้วยวิธี modified one tube osmotic fragility test (OF test) หรือการตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (Rbc indices) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ เพื่อคัดกรองเบื้องต้น เนื่องจากผู้ที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จะให้ผลการทดสอบ OF test เป็นบวกและมีเม็ดเลือดแดงขนาดเล็กโดยมีค่า MCV น้อยกว่า 80 เฟมโตลิตร จากนั้นจึงส่งตัวอย่างดังกล่าวไปตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR อีกครั้งหนึ่งเพื่อให้การวินิจฉัยที่แน่นอนต่อไป ตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อการตรวจกรองไม่จำเป็นต้องได้รับการตรวจด้วยวิธี PCR^(5, 11,12) แนวทางดังกล่าวนี้ใช้ได้ผลดีในหลายแห่ง⁽¹³⁻¹⁵⁾ แต่มีข้อจำกัดในการตรวจด้วยวิธี PCR ซึ่งไม่สามารถให้บริการได้อย่างทั่วถึง ห้องปฏิบัติการที่เปิดให้บริการตรวจด้วยวิธี PCR จึงต้องรับตรวจตัวอย่างเป็นจำนวนมากใช้เวลาและแรงงานในขั้นตอนการตรวจและขั้นตอนหลังจากการทำ PCR มาก จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค real-time PCR ขึ้นมาใช้ในการตรวจแทนเพื่อให้สามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้สะดวกขึ้น^(16,17) รายงานวิจัยนี้แสดงถึงผลของการทดลองใช้การทดสอบ OF test และค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัยอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธี GAP-PCR ที่ใช้ในงานประจำวัน

วัสดุและวิธีการศึกษา

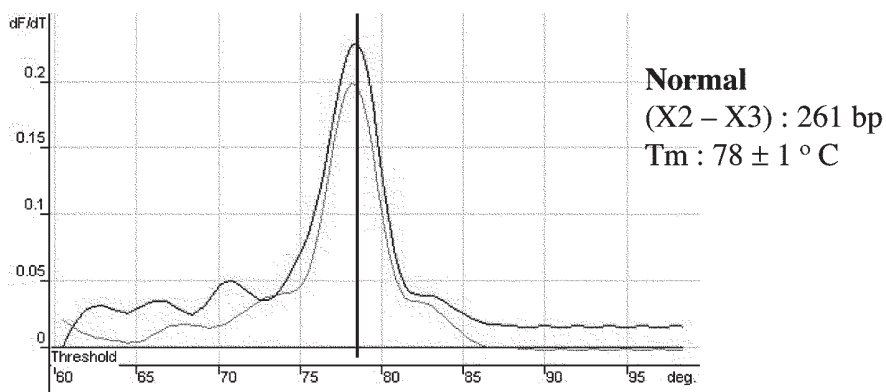
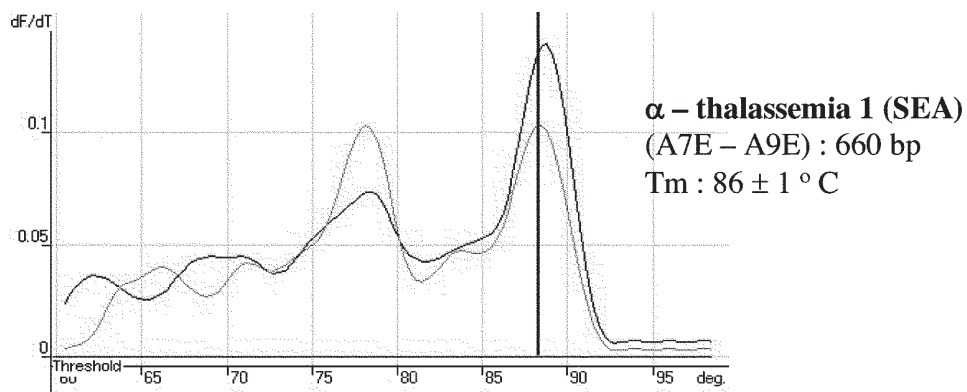
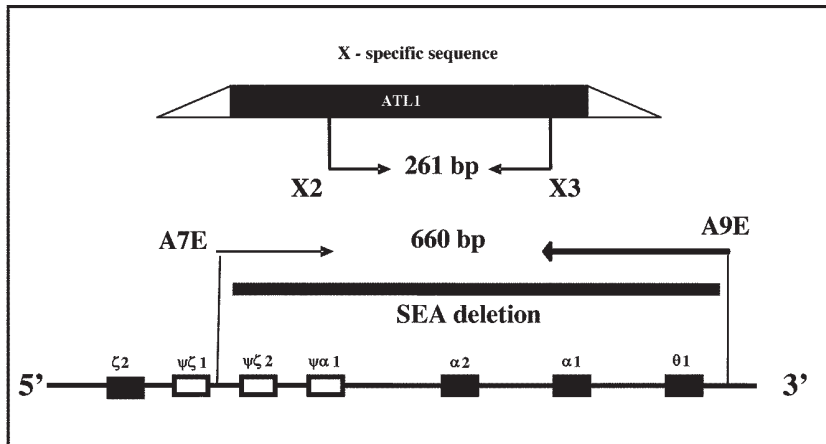
ตัวอย่างเลือดและการตรวจเลือด

เป็นตัวอย่างเลือดของหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสที่เข้ารับบริการการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่หน่วยบริการธาลัสซีเมีย สถานบริการสุขภาพเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวนรวม 98 ราย โดยตัวอย่างเลือดเหล่านี้เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ OF test และมีค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงน้อยกว่า 80 เฟมโตลิตร การตรวจคัดกรอง OF test ใช้น้ำยาสำเร็จรูป KKKU-OF ส่วนการตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex Xt-2000i (Sysmex corporation, Kobe, Japan) โครงการวิจัยนี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE 501111)

การตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินและการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดที่มีผลการตรวจคัดกรอง OF test เป็นบวกหรือตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดงแล้วมีค่า MCV น้อยกว่า 80 เฟมโตลิตร ถูกนำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ HPLC (VariantsTM, modified β -thal short program: Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) หรือเครื่อง CAPILLARYSTM 2 (Capillary electrophoresis system, Sebia, France) ส่วนการ

ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอนั้น ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีมาตรฐานเพื่อนำไปตรวจหาอินอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion ด้วยวิธี conventional GAP-PCR⁽¹²⁾ โดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Co., USA) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในงานประจำวันควบคู่กับการตรวจด้วยวิธี Real time PCR โดยใช้ SyBr green I เป็นสารเรืองแสงเพื่อช่วยในการตรวจจับปฏิกิริยาร่วมกับการวิเคราะห์ melt curve โดยใช้เครื่อง Rotor gene 3000 (Corbett Research, Australia)⁽¹⁸⁾ โดยดัดแปลงให้มีการเพิ่มการเพิ่มขึ้นส่วนจาก X-chromosome⁽¹⁹⁾ เป็น internal control ดังแสดงใน **รูปที่ 1** และลำดับเบสของไพรเมอร์ (A7E & A9E) และ (X2 & X3) ที่ใช้แสดงไว้ใน **ตารางที่ 1** ปฏิกิริยา real time PCR มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1.8 pmole ของไพรเมอร์ A7E และ 1.2 pmole ของไพรเมอร์ A9E, X2 และ X3, 200 μ M dNTPs, 1.005 mM betaine, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatine, 0.1 X SyBr green I และ 1 unit Taq polymerase (Promega Co., USA) หลังจากขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอรอบแรกที่ 94 °C นาน 3 นาทีแล้ว เข้าสู่ขั้นตอนของ real time PCR ที่แต่ละรอบประกอบด้วย (94 °C 40 วินาที - 61 °C 20 วินาที - 72 °C 2 นาที) จำนวน 32 รอบ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ตรวจวิเคราะห์ลักษณะ melt curve ของแต่ละปฏิกิริยาจากเครื่องที่อุณหภูมิระหว่าง 60 °C - 99 °C



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจยืนยันอัลฟาธาลัสซีเมีย ชนิด SEA deletion ขนาด 660 bp (A7E & A9E) ด้วยวิธี real time PCR โดยมี X-specific fragment (X2 & X3) ขนาด 261 bp เป็น internal control ซึ่งมีค่า T_m เท่ากับ 86 ± 1 °C และ 78 ± 1 °C ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion โดยวิธี real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ melt curve พร้อมค่า melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์แต่ละชนิด

Primer	Sequence (5' – 3')	Tm (°C)
A7E	CTC TGT GTT CTC AGT ATT GGA GGG AAG GAG	62.6
A9E	ATA TAT GGG TCT GGA AGT GTA TCC CTC CCA	62.6
X2	TCG CCT TTC TCA AAT TCC AAG	55.4
X3	GAA ATT ACA CAC ATA GGT GGC ACT	59.7

ผลการศึกษา

รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion โดยวิธี real-time PCR และการวิเคราะห์ลักษณะ melt curve โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก X-chromosome เป็น internal control พบลักษณะของกราฟที่มีความจำเพาะต่อยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion มีค่า Tm เท่ากับ $86 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก X-chromosome มีค่า Tm เท่ากับ $78 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ทำให้สามารถแยกออกจากกันและใช้ในการวินิจฉัยได้โดยง่ายเมื่อนำเทคนิคการตรวจยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 นี้ไปใช้ในการตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion ในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 98 รายที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองมาก่อนแล้วด้วยวิธี OF test หรือมีค่า MCV น้อยกว่า 80 เฟมโตลิตร ซึ่งดำเนินอยู่ในงานประจำวันที่หน่วยบริการธาลัสซีเมีย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเปรียบเทียบผลการตรวจที่ได้กับการตรวจด้วยวิธี conventional GAP-

PCR พบว่าให้ผลการตรวจตรงกันทุกรายและตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion จำนวน 22 รายจากจำนวนที่ศึกษาทั้งหมด 98 ราย (ร้อยละ 22.5) อีก 76 รายให้ผลลบต่อยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion และเมื่อนำผลการตรวจทางโลหิตวิทยาอื่นๆ มาประกอบการวินิจฉัยพบว่าตัวอย่างทั้ง 22 รายนี้ประกอบด้วย ผู้ที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion จำนวน 14 ราย ผู้ที่เป็นโรคฮีโมโกลบินเอช 3 ราย และอีก 5 รายที่เหลือเป็นพาหะฮีโมโกลบินอีร่วมกับอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 โดยมีข้อมูลทางโลหิตวิทยาแสดงไว้ใน **ตารางที่ 2** ซึ่งทุกรายมีค่า MCV และ MCH ต่ำแต่มีค่า RDW สูงกว่าปกติเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานไว้แล้ว⁽¹²⁾ ส่วนตัวอย่าง 5 รายที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ร่วมกับพาหะฮีโมโกลบินอื่น มีระดับฮีโมโกลบินอีอยู่ในช่วงร้อยละ 17.1 ± 2.9 ซึ่งต่ำกว่าผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีอย่างเดียว^(11,20)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาของตัวอย่างทั้ง 22 รายที่ตรวจพบยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion แสดงเป็นข้อมูลดิบหรือ mean $\pm$ standard deviation ตามความเหมาะสม

Parameter	α – thalassemia 1 trait	Hb H disease	Hb E trait with α – thalassemia 1
Number	14	3	5
Rbc ($\times 10^{12}$)	5.8 ± 0.1	5.94	5.4 ± 1.0
Hb (g/dl)	12.4 ± 1.6	10.1	11.0 ± 1.3
Hct (%)	39.4 ± 5.2	35.3	33.1 ± 4.1
MCV (fl)	67.5 ± 2.5	59.4	61.5 ± 7.6
MCH (pg)	21.3 ± 0.8	17.0	20.4 ± 2.5
MCHC (g/dl)	31.6 ± 1.0	28.6	33.2 ± 0.3
RDW-CV (%)	28.0 ± 12.0	27.7	17.1 ± 12.9
Hb type	A ₂ A	A ₂ AH	EA
Hb A ₂ / E (%)	2.4 ± 0.2	1.1 ± 0.2	18.8 ± 2.6

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในประเทศไทยและประเทศอื่นๆในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การดำเนินงานในโปรแกรมการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจะมุ่งเน้นการป้องกันการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 3 ชนิด คือ โฮโมไซกัสอัลฟาธาลัสซีเมีย บีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์ และ บีตาธาลัสซีเมีย / ฮีโมโกลบินอี⁽¹⁾ เป้าหมายสำคัญในการตรวจกรองจึงหมายถึงการตรวจค้นหาผู้ที่เป็นพาหะที่จะทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเหล่านี้ ซึ่งประกอบด้วย พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 พาหะบีตาธาลัสซีเมีย และผู้ที่มีฮีโมโกลบินอี ทั้งที่เป็นพาหะและโฮโมไซโกตการตรวจคัดกรองเบื้องต้นโดยทั่วไปนิยมใช้วิธี OF test หรือ MCV ร่วมกับ DCIP ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจกรองจะถูกส่งไปตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินต่อไป ซึ่งจะสามารถให้การวินิจฉัยผู้ที่เป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีได้

ตัวอย่างรายใดที่มีปริมาณ Hb A₂ อยู่ในเกณฑ์ปกติหรือมีระดับ Hb E น้อยกว่าร้อยละ 25 จะถูกนำไปตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ด้วยวิธี PCR ต่อไป ซึ่งส่วนใหญ่นิยมตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion ซึ่งพบได้บ่อยกว่าชนิด THAI deletion^(5,10,11) แนวทางดังกล่าวนี้ใช้ได้ผลดีและสามารถค้นหาผู้ที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีปัญหาสำคัญอยู่ที่ความยุ่งยากของการตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion โดยวิธี PCR ซึ่งไม่สามารถเปิดให้บริการได้ในทุกโรงพยาบาลแต่จะใช้วิธีส่งตัวอย่างที่สงสัยไปขอรับการตรวจยังศูนย์บริการตรวจต่างๆที่มีความพร้อมมากกว่าตรวจให้ ซึ่งแม้ว่าการตรวจยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จะสามารถทำได้ไม่ยากนักโดยวิธี conventional GAP-PCR และสามารถตรวจได้โดยตรงจากเลือดโดยไม่ต้องเตรียมเป็นดีเอ็นเอก่อน^(10,12) แต่เมื่อต้องทำการตรวจในจำนวนเป็นตัวอย่างมาก

มักมีปัญหาในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสภายหลังการทำ PCR เพื่อแยกชนิดของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้และยังต้องมีขั้นตอนการย้อมด้วยสาร ethidium bromide ที่มีอันตราย และยังทำให้เสียเวลาสิ้นเปลืองแรงงานและอาจเกิดความผิดพลาดได้ด้วยการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วขึ้นโดยไม่ต้องมีขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอภายหลังจากการทำ PCR จึงเป็นแนวทางการแก้ปัญหาที่ดี จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค real time PCR ขึ้นมาใช้ตรวจแทน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแต่ละวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นให้ผลการตรวจที่ถูกต้องรวดเร็ว มีความน่าเชื่อถือ สามารถลดภาระงานในการตรวจทางห้องปฏิบัติการลงได้มากและเริ่มนำมาใช้ในการดำเนินงานแล้วหลายแห่งโดยเฉพาะเมื่อนำมาใช้ร่วมกับระบบการวิเคราะห์ melt curve แบบ high resolution^(16,17,21)

การศึกษาครั้งนี้ได้นำหลักการของ real-time PCR นี้มาพัฒนาเทคนิคการตรวจหา ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด SEA deletion⁽¹⁸⁾ โดยการวิเคราะห์ melt curve ของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR คัดแปลงโดยเพิ่มชิ้นส่วนของ X-chromosome เป็นตัวควบคุมภายในของปฏิกิริยา PCR ผลการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 และชิ้นส่วนจาก X-chromosome มีลักษณะของ melt curve ที่มีค่า Tm แตกต่างกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 1) จึงสามารถให้การวินิจฉัยผู้ที่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ได้โดยใช้ชิ้นส่วนจาก X-chromosome เป็นตัวควบคุม จากการนำไปศึกษาในตัวอย่างที่สงสัยว่าจะมียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 98 รายซึ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจกรองเบื้องต้นด้วยวิธี OF test และ MCV ตรวจพบผู้ที่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 22 ราย โดยให้ผลตรงกับผลการตรวจด้วยวิธี conventional GAP-PCR ประกอบกับผู้ที่เป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 14 ราย ผู้ที่เป็นโรคฮีโมโกลบินเอช 3 ราย และเป็นฮีโมโกลบินอีร่วมกับอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 5 ราย ที่เหลืออีก 76 ราย ตรวจไม่พบยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 แต่อย่างใด แต่อาจเป็นพาหะธาลัสซีเมียหรือความผิดปกติอย่างอื่น

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิค real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถลดภาระงานตรวจทางห้องปฏิบัติการลงได้อย่างมาก และเชื่อว่าเมื่อนำไปใช้ร่วมกับการตรวจคัดกรองอย่างง่ายเช่น OF test หรือตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดง จะสามารถใช้ในการตรวจหาผู้ที่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ส่งเสริมให้การดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงสามารถดำเนินงานได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยบางส่วนจาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา สกอ.

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 1987; 11: 65-88.
2. Lau YL, Chan LC, Chan AYY, Ha SY, Yeung CY, Waye JS, et al. Prevalence and genotypes of α - and β - thalassemia carriers in Hong Kong: implications for population screening. N Engl J Med 1997; 336: 1298-301.
3. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. 4th ed. 2001 Blackwell, Oxford, UK.
4. Chui DKH, Waye JS. Hydrops fetalis caused by α - thalassemia: an emerging health care problem. Blood 1998; 91: 2213-22.
5. สุพรรณ พุเจริญ, กุลนภา พุเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรคของประเทศไทย. สงขลานครินทร์เวชสาร 2545; 20: 43-55.

6. Fucharoen S, Winichagoon P, Sirithanaratkul N, Chowthaworn J, Pootrakul P. α - and β -thalassemia in Thailand. *Ann NY Acad Sci* 1998; 850: 412-4.
7. Boonsa S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Wiangnon S, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. The diverse molecular basis and hematological features of Hb H and AEBart's diseases in northeast Thailand. *Acta Haematol* 2004; 111: 149-54.
8. Winichagoon P, Higgs DR, Goodbourn SE, Clegg JB, Weatherall DJ, Wasi P. The molecular basis of α -thalassemia in Thailand. *EMBO J* 1984; 3: 1813-8.
9. Fucharoen S, Fucharoen G, Wanhakit C, Srithong W. Molecular basis of α^0 -thalassemia in northeast of Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 1995; 26: 249-51.
10. 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.
11. Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Sae-ung N, Dangwibul S, Fucharoen S. A simplified screening strategy for thalassemia and hemoglobin E in rural communities of Southeast Asia. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 364-72.
12. Panyasai S, Sringam P, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. A simplified screening for α -thalassemia 1 (SEA type) using a combination of a modified osmotic fragility test and a direct PCR on whole blood cell lysates. *Acta Haematol* 2002; 108: 74-8.
13. ยุพิน ใจแปง, กุลนภา พุ่เจริญ, เกียรติกร กิจเจริญ, ณัฐยา แซ่อึ้ง, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการแบบง่ายเพื่อตรวจกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2536; 5: 131-8.
14. ยศสมบัติ จังตระกุล, วุฒิชัย สุขสนิท, ชีรวัฒน์ คำแก้ว, ดวงฤดี จังตระกุล, กุลนภา พุ่เจริญ. ประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 บีตาธาลัสซีเมีย และ ฮีโมโกลบินอี ที่หน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2551; 20: 97-104.
15. อ่อนคำ ชาวงสี, กุลนภา พุ่เจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, ณัฐยา แซ่อึ้ง, สุพรรณ พุ่เจริญ. การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีในหญิงตั้งครรภ์ที่โรงพยาบาลศูนย์สุขภาพแม่และเด็กนครหลวงเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2550; 19: 34 - 41.
16. Sangkitporn SK, Wangkahat K, Sangnoi A, Songkharm B, Charoenporn P, Sangkitporn S. Rapid diagnosis of alpha(o)-thalassemia using the relative quantitative PCR and the dissociation curve analysis. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 359-65.
17. Liu J, Yan M, Wang Z, Wang L, Zhou Y, Xiao B. Molecular diagnosis of alpha-thalassemia by combining real-time PCR with SYBR Green 1 and dissociation curve analysis. *Transl Res* 2006; 148: 6-12.
18. Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K. Development and application of a real time quantitative PCR for detection of fetal α^0 -thalassemia from maternal plasma. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1075: 103-7.
19. Tungwiwat W, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Non-invasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chim Acta* 2003; 334: 173-7.
20. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. Molecular and hematologic features of hemoglobin E heterozygotes with different forms of α -thalassemia in Thailand. *Ann Hematol* 2003; 82: 612-6.
21. Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansermisri T. Detection of alpha thalassemia 1 Southeast Asian type using real-time gap PCR with SYBR Green 1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol* 2008; 80: 510-4.