

นิพนธ์ต้นฉบับ

OF test กับ α thalassemia -2

สุภารัตน์ ชันเขียว*, อนุสรณ์ แคนชนสารมาก*, อักษรา ทองประทุม, ปฐม ปฐมธนพงศ์, รัตติกาล แซ่ตั้ง** และ
ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี**

บทคัดย่อ

บทนำ: One tube osmotic fragility test (OF test) เป็นการตรวจกรองกลุ่มพาหะและโรคธาลัสซีเมีย ในปัจจุบัน
แต่ไม่สามารถตรวจกรองทุกรายได้ในกลุ่มพาหะของ α thalassemia-2 ซึ่งพบได้หลายชนิดในประเทศไทย
วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความสามารถ ของ OF test ในการตรวจกรอง α thalassemia-2 ที่พบบ่อยใน
ประเทศไทย

วิธีการ: กลุ่มตัวอย่างเลือดจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ทดสอบด้วย วิธี Two minutes OF test ให้
ผลลบจำนวน 50 ราย และ ให้ผลบวกจำนวน 50 ราย นำมาทดสอบหาความผิดปกติของ α thalassemia
-2 ชนิดยีนแหว่งขนาด 3.7 กิโลเบส, 4.2 กิโลเบส และชนิด Hb Constant Spring ด้วยวิธี PCR (Poly-
merase Chain Reaction)

ผลการทดลอง: พบ α thalassemia-2 ชนิดยีนแหว่งขนาด 3.7 กิโลเบส จำนวน 3 ราย (6%) ในกลุ่ม OF
test ลบ และจำนวน 17 ราย (34%) ในกลุ่ม OF test บวก ชนิดยีนแหว่ง 4.2 กิโลเบส ไม่พบในกลุ่ม OF
test ลบ และจำนวน 1 ราย (2%) ในกลุ่ม OF test บวก และชนิด Hb Constant Spring จำนวน 3 ราย
(6%) ในกลุ่ม OF test ลบ และจำนวน 4 ราย (8%) ในกลุ่ม OF test บวก

สรุป: OF test สามารถตรวจกรอง α thalassemia-2 ได้เพียง 22 ราย ใน 28 ราย (78.6%)
และชนิดที่พบบ่อยที่สุดในภาคเหนือประเทศไทยคือ ชนิดยีนแหว่งขนาด 3.7 กิโลเบส พบ 20 รายใน 28
ราย (71.4%) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2547; 37: 175-179.

คำรหัส: One tube osmotic fragility test (OF test), α thalassemia-2

* คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : OF test and α thalassemia-2

**Suparat Khunkhew*, Anusara Danthanasaramak*, Aksara Thongprachom*,
Phathom Phathomthanapong*, Rattika Saetung*, and Toapong Saguansermisri***

One tube osmotic fragility (OF test) is one of the most useful screening test, eventhough it can not detect every cases of α thalassemia-2 carriers. The purpose of the study was to determine the capability of OF test as a screening test for common types of α thalassemia-2 carriers in Thai population. The detections of common α thalassemia-2 genes including the 3.7 kb gene deletion type, 4.2 kb gene deletion type and the Hb Constant Spring by the polymerase chain reaction (PCR) technique were carried out in 50 blood samples with negative two minutes OF test and 50 blood samples with positive results. The 3.7 kb gene deletion type of α thalassemia-2 was found in 3/50 (6%), no case of 4.2 kb gene deletion type, and 3/50 (6%) of Hb Constant Spring, from the negative OF test blood samples. The 3.7 kb gene deletion type of α thalassemia-2 was found in 17/50 (34%), the 4.2 kb gene deletion type 1/50 (2%) , and 4/50 (8%) of Hb Constant Spring, from the positive OF test blood samples. The Of test can detect 22/28 (78.6) of α thalassemia-2 blood samples. The most common α thalassemia-2 gene carrier in northern Thai population is the the 3.7 kb gene deletion type (20/28 or 71.4%). *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2004; 37: 175-179.*

Key words: One tube osmotic fragility test (OF test),a thalassemia-2

* Faculty of Associated Medical Sciences

** Faculty of Medicine, Chiang Mai University

บทนำ

อัลฟาธาลัสซีเมีย (α thalassemia) เป็นภาวะที่มีการสร้างสายโกลบินชนิดอัลฟาน้อยลง (α thalassemia-2 หรือ α^+) หรือไม่มีการสร้างสายอัลฟาเลย (α thalassemia-1 หรือ α^0) ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียเป็นยีนทางพันธุกรรมที่มีความชุกสูงมาก โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (เกาหลี จีน ไต้หวัน) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งบางส่วนของประเทศในแถบเมดิเตอร์เรเนียน ซึ่งเป็นแถบประเทศที่เกิดร่วมกับการระบาดของเชื้อมาลาเรีย¹ การเกิดร่วมกันของยีน α thalassemia-1 หรือ α^0 ทั้งคู่เป็นสาเหตุของการเกิด Hb Bart's hydrop fetalis และการเกิดร่วมกันของ α thalassemia-1 หรือ α^0 และ α thalassemia-2 หรือ α^+ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิด Hb H disease ชนิดของ α thalassemia-1 หรือ α^0 ที่พบมากในประเทศไทยได้แก่ South East Asian type มีการขาดหายในขนาด 17.5 kb ตั้งแต่บริเวณ ψ จนถึง 3' HVR สำหรับ α thalassemia-2 ชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ ชนิดยีนแหว่งขนาด 3.7 กิโลเบส ($_{-}\alpha^{3.7}$) เกิดจาก unequal crossing over ในบริเวณ Z box ทำให้ DNA ระหว่าง α_1 ระหว่าง α_2 ขาดหายไป 3.7 กิโลเบสเรียกว่าชนิด rightward deletion ได้ $_{-}\alpha^{3.7}$ และ $\alpha\alpha$ -anti 3.7 ชนิดยีนแหว่งขนาด 4.2 กิโลเบส ($_{-}\alpha^{4.2}$) เกิดจาก unequal crossing over ในบริเวณ x box ทำให้ DNA บริเวณ α_2 globin gene ขาดหายไป 4.2 กิโลเบส เรียกว่าชนิด

leftward deletion เหลือเฉพาะ α globin gene บนโครโมโซมหนึ่งอีกโครโมโซมจะเป็น $\alpha\alpha$ -anti 4.2 มี α globin gene 3 ตำแหน่ง และ Hb Constant Spring เป็น non deletion type α thalassemia ที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย (ประมาณร้อยละ 4) มีความผิดปกติที่ terminal codon (TAA CAA) ทำให้เกิดการแปรรหัสต่อให้มีการสร้างกรดอะมิโนเพิ่มอีก 31 ตัว รวมเป็น 172 ตัว² และถึงแม้ α thalassemia-2 หรือ α^+ จะไม่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเมื่อเทียบกับ α thalassemia-1 หรือ α^0 แต่พบความชุกของพาหะชนิดนี้สูงในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้านี้ต้องการศึกษาความสามารถของวิธีการตรวจกรอง One tube osmotic fragility (OF test) ว่าสามารถตรวจกรองกลุ่มพาหะ α thalassemia-2 หรือ α^+ นี้ได้ทุกรายหรือไม่

วิธีการ : กลุ่มตัวอย่างเลือดจากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่ทดสอบด้วย วิธี Two minutes OF test³ ให้ผลลบจำนวน 50 ราย และให้ผลบวกจำนวน 50 ราย นำมาทดสอบหาความผิดปกติของ α thalassemia-2 (α^+) ชนิดยีนแหว่งขนาด 3.7 กิโลเบส, 4.2 กิโลเบส และชนิด Hb Constant Spring ด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)⁴ โดยการคำนวณชนิดและขนาดของ Primers ที่ใช้ในการทดสอบดังตารางต่อไปนี้⁵ :-

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของ primer ในการตรวจหา α thalassemia-2 (α^+) ชนิด rightward deletion $\alpha^{3.7}$ bp และวิธีการอ่านผล

Name	Sequence	Location
F :	5' AAGTCCACCCCTTCCTTCCTCACC 3'	32755 - 32778
R ₁ :	5' ATGAGAGAAATGTTCTGGCACCTGCACTTG 3'	34942 - 34971
R ₂ :	5' TCCATCCCCTCCTCCCGCCCCTGCCTTTTC 3'	38522 - 38550

- ผลของ PCR product คนปกติจะพบแถบ DNA ขนาด 2217 bp หรือ 2213 bp
- ผลของ PCR product ของ heterozygous α thalassemia-2 (α^+) ชนิดยีนแหว่งขนาด 3.7 กิโลเบส จะพบแถบ DNA 2 แถบ ขนาด 2217 bp หรือ 2213 bp และ 1963 bp
- ผลของ PCR product ของ homozygous α thalassemia-2 (α^+) ชนิดยีนแหว่งขนาด 3.7 กิโลเบส จะพบแถบ DNA 1 แถบ ขนาด 1963 bp

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของ primer ในการตรวจหา α thalassemia-2 (α^+) ชนิด leftward deletion $\alpha^{4.2}$ bp และวิธีการอ่านผล

Name	Sequence	Location
F :	5' TCCTGATCTTTGAATGAAGTCCGAGTAGGC 3'	30283 - 30312
R ₁ :	5' TGGGGGTGGGTGTGAGGAGACAGGAAAGAGAGA 3'	31760 - 31789
R ₂ :	5' ATCACTGATAAGTCATTTCTGGGGGTCTG 3'	36176 - 36205

- ผลของ PCR product คนปกติจะพบแถบ DNA ขนาด 1510 bp
- ผลของ PCR product ของ heterozygous α thalassemia -2 (α^+) ชนิดยีนแหว่งขนาด 4.2 กิโลเบส จะพบแถบ DNA 2 แถบ ขนาด 1510 bp และ 1725 bp
- ผลของ PCR product ของ homozygous α thalassemia -2 (α^+) ชนิดยีนแหว่งขนาด 4.2 กิโลเบส จะพบแถบ DNA 1 แถบ ขนาด 1725 bp

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดของ primer ในการตรวจหา α thalassemia -2 (α^+) ชนิด Constant Spring (CS) และวิธีการอ่านผล

Name	Sequence	Location
CS - F :	5' TGCGGGCCTGGGCCGCACTGA 3'	7224 - 7244
CS - R :	5' GCCGCCCCACTCAGACTTTATT 3'	7479 - 7500

- ผลของ PCR product คนปกติจะพบแถบ DNA 2 แถบ ขนาด 165 bp และ 111 bp
- ผลของ PCR product ของ heterozygous α thalassemia-2 (α^+) ชนิด Constant Spring (CS) จะพบแถบ DNA 3 แถบ ขนาด 276 bp ,165 bp และ 111 bp
- ผลของ PCR product ของ homozygous α thalassemia-2 (α^+) ชนิด Hb Constant Spring จะพบแถบ DNA 1 แถบ ขนาด 276 bp

ผลการทดลอง

พบ α thalassemia-2 ชนิดยืนแห่วงขนาด 3.7 กิโลเบส จำนวน 3 ราย (6%) ในกลุ่ม OF test ลบ และจำนวน 17 ราย (34%) ในกลุ่ม OF test บวก ชนิดยืนแห่วง 4.2 กิโลเบส ไม่พบในกลุ่ม OF test ลบ และจำนวน 1 ราย (2%) ในกลุ่ม OF test บวก และชนิด Hb Constant Spring จำนวน 3 ราย (6%) ในกลุ่ม OF test ลบ และจำนวน 4 ราย (8%) ในกลุ่ม OF test บวก

วิจารณ์และสรุป:

OF test สามารถตรวจกรอง α thalassemia -2 (α^+) ได้เพียง 22 ราย ใน 28 ราย (78.6%) แสดงว่า OF test ไม่สามารถตรวจคัดกรอง α thalassemia -2 (α^+) ได้ทุกรายเช่นเดียวกับ Hb E และชนิดที่พบบ่อยที่สุดในภาคเหนือประเทศไทยคือ ชนิดยืนแห่วงขนาด 3.7 กิโลเบส พบ 20 ราย ใน 28 ราย (71.4%) ของ α thalassemia-2 (α^+) ที่พบทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Hill AVS, Flint J, Weatherall DJ, et al. Alpha thalassemia and the malaria hypothesis. *Acta Haematol* 1987; 78: 173 -9.
2. วิปรี วิประภษิต, วรพรรณ ตันไพจิตร. ความรู้เกี่ยวกับธาลัสซีเมียชนิดอัลฟ่า. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2542; 3: 219 -30.
3. Sanguansermisri T, Phumyu N, Chomchuen S. et al. Screening for α thalassemia-1 heterozygous in expecting couples by the combination of a simple erythrocyte osmotic fragility test and a PCR based method. *Community Genetics* 1999; 2: 26-9.
4. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี. DNA Diagnosis for α thalassemia-1 (SEA) by PCR. ธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง การรักษา การควบคุม และป้องกัน. เชียงใหม่, 2543: 150 -7.
5. Makonkawkeyoon L, Sanguansermisri T, Asato T, Nakashima Y. Rapid detection of chain termination mutations in the α_2 -globin gene. *Blood*, 1993; 82.11: 3503 - 4.