Original Article

Development of α-thalassemia1 Diagnostic Test using Multiplex gap PCR technique

*Wijit Saowarat, B.sc. (Medical Technology)**

ABSTRACT

Background : Thalassemia is an inherited anemia with high prevalence in Surin province. Clinical laboratory services of Surin hospital therefore developed the molecular diagnostic test for thalassemia determination in Surin hospital and from laboratory network.

Objective : To evaluate of the α-thalassemia1 (SEA-deletion, THAI-deletion) test using Multiplex gap-PCR method and determine its reliability.

Methods : Blood sample from 103 patients with hemoglobin typing were determined for the α-thalassemia1 (SEA-deletion, THAI-deletion) with Multiplex gap-PCR method.

Results : Total 103 blood samples included 8 samples of α-thalassemia1 patient, 13 samples of α-thalassemia gene negative patient and 83 samples of unidentified α-thalassemia gene were tested by the developed test. Positive α-thalassemia1 (SEA-deletion) finding obtained in each group were 8, 0 and 6 respectively.

Conclusion : The α-thalassemia1 diagnostic test using multiplex gap PCR has absolute in both sensitivity and specificity with 100% after evaluation. Moreover positive finding for unidentified α-thalassemia1 were 4.98% with this method. Thus, Multiplex gap-PCR method has reliability and applicable for thalassemia diagnostic testing in the molecular laboratory service of Surin hospital.

Keywords : α-thalassemia 1, Multiplex gap PCR

**Medical Technologist, Professinal Level, Department of Medical Technology, Surin Hospital, Surin province, Surin, Thailand*

นิพนธ์ต้นฉบับ

พัฒนาการตรวจวินิจฉัย α-thalassemia 1 ด้วยเทคนิค Multiplex gap PCR

*วิจิตร เสาวรัจ, วท.บ.(เทคนิคการแพทย์)**

บทคัดย่อ

หลักการและเหตุผล : ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางเรื้อรังที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมและเป็นโรคที่มีความชุกสูงที่จังหวัดสุรินทร์ ดังนั้น กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ ได้พัฒนาศักยภาพบริการตรวจวิเคราะห์ทางอณูโมเลกุล เพื่อให้บริการตรวจวิเคราะห์ยืนยันโรคธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรงพยาบาลสุรินทร์และรับตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ต่อจากเครือข่ายห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ : ประเมินการตรวจวิเคราะห์ α-thalassemia1 (SEA-deletion, THAI-deletion) ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR ที่พัฒนาขึ้น เพื่อความน่าเชื่อถือของผลตรวจวิเคราะห์ในการให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการศึกษา : ตัวอย่างโลหิตที่ได้รับการตรวจหาชนิดฮีโมโกลบิน จำนวน 103 ราย นำมาตรวจหา α-thalassemia1 (SEA-deletion, THAI-deletion) ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR ที่พัฒนาขึ้น

ผลการศึกษา : ผลตรวจตัวอย่างโลหิต จำนวน 103 ราย พบว่า กลุ่มผู้ป่วยโรค α-thalassemia1 8 ราย กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ 13 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ 82 ราย ให้ผลบวก 8, 0, 6 ราย ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา : วิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ให้ผลประเมินความไวและความจำเพาะของการทดสอบร้อยละ 100, ร้อยละ 100 ตามลำดับ และตรวจพบยีนในกลุ่มที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ ร้อยละ 7.3 ดังนั้นผลการตรวจวิเคราะห์นี้ มีความน่าเชื่อถือสามารถให้บริการตรวจวิเคราะห์ได้ และเพิ่มบริการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียทางห้องปฏิบัติการทางอณูโมเลกุลของโรงพยาบาลสุรินทร์

คำสำคัญ : แอลฟ่า-ธาลัสซีเมีย 1, Multiplex gap PCR

**นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์*

หลักการและเหตุผล

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางเรื้อรังที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดจากความผิดปกติของยีนที่สังเคราะห์ฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพกับแทบทุกอวัยวะในร่างกาย ผู้ที่มียีนธาลัสซีเมียอาจจะเป็นผู้ที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคหรือพาหนะ ผู้ป่วยอาจจะแสดงอาการของโรคแตกต่างกันตั้งแต่มีโลหิตจางเล็กน้อย โลหิตจางมาก เรื้อรังไปจนถึงอาการรุนแรงมาก จนเสียชีวิตตั้งแต่ในครรภ์มารดาหรือหลังคลอดไม่นาน ส่วนผู้ที่เป็นพาหะมีสุขภาพปกติเหมือนคนทั่วไป แต่สามารถถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติไปสู่ลูกหลานได้ อุบัติการณ์ในประเทศไทยพบว่าประชากรที่เป็นพาหนะ ประมาณร้อยละ 30–40 หรือ ประมาณ 18–24 ล้านคน มีผู้ที่เป็นโรค ประมาณร้อยละ 1 หรือ ประมาณ 6 แสนคน พบว่ามีร้อยละ 20–30 มียีน α-thalassemia ร้อยละ 3-9 มียีน β-thalassemia และพบยีนของฮีโมโกลบินผิดปกติ 2 ชนิด คือ hemoglobin E (Hb E) โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 13 และพบสูงขึ้นคนอีสานถึงร้อยละ 30–40 ที่จังหวัดสุรินทร์พบ Hb E สูงถึงร้อยละ 52 ในแต่ละปีจากหญิงตั้งครรภ์ประมาณ 1 ล้านคน มีหญิงตั้งครรภ์ที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียประมาณ 5 หมื่นคน และมีเด็กเกิดใหม่ป่วยเป็นโรคเพิ่มขึ้นประมาณ 12,000 คน ดังนั้นโรคธาลัสซีเมียจึงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข[1,2] โดยเฉพาะจังหวัดสุรินทร์ จากผลตรวจหาชนิดฮีโมโกลบิน (Hemoglobin Typing) ที่กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลสุรินทร์ ในปี 2556 จำนวน 993 ราย ตรวจพบ กลุ่มผู้ป่วยที่มีฮีโมโกลบิน ชนิด A2A ร้อยละ 26.5 ซึ่งอาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมด้วย ร้อยละ 79.9 กลุ่มผู้ป่วยที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb E ร้อยละ 61 ซึ่งอาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ร้อยละ 56.4 กลุ่มผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย ร้อยละ 12.5 ซึ่งเป็นโรค α-thalassemia ร้อยละ 28.2 β-thalassemia ร้อยละ 57.2 αβ-thalassemia ร้อยละ 13.7 แสดงถึงความชุกของยีน α-thalassemia และ β-thalassemia ในกลุ่มประชากรจังหวัดสุรินทร์สูงมาก จึงมีการถ่ายทอดยีนจาก พ่อ-แม่ ไปสู่ลูก ทำให้ปัญหาโรคธาลัสซีเมียมีความสำคัญทั้งกลุ่มผู้ป่วยโรคโลหิตจางและหญิงตั้งครรภ์ ดังนั้น กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ ต้องพัฒนาศักยภาพบริการตรวจวิเคราะห์ทางอณูโมเลกุล เพื่อให้บริการตรวจวิเคราะห์ยืนยันโรคธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรงพยาบาลสุรินทร์และรับตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ต่อจากเครือข่ายห้องปฏิบัติการจังหวัดสุรินทร์ โดยเริ่มจากพัฒนาวิธีตรวจหาส่วนหายของ gene ในกลุ่ม α-thalassemia1 (SEA-deletion, THAI-deletion) ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR เพื่อให้บริการผู้ป่วยโรคโลหิตจางและกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ซึ่งมีความเสี่ยงที่ให้บุตรที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จากนั้นพัฒนาวิธีการตรวจหาความผิดปกติของยีน thalassemia ให้ครอบคลุมทั้ง α-thalassemia β-thalassemia ต่อไป

อุบัติการณ์ผลตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α-thalassemia1 ในประเทศไทย พบว่า ตรวจพบทั้งชนิด SEA delete และ THAI delete ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิด SEA delete แต่ความผิดปกติทั้งสองชนิดมีความสำคัญเช่นกันเมื่อมีการถ่ายทอดจาก พ่อ-แม่ สู่ลูก ส่งผลให้เกิดบุตรเกิดเป็นโรค Hb Bart's hydrop fetalis เช่นเดียวกัน จึงต้องตรวจหายีนทั้งสองชนิดในการตรวจหา α-thalassemia1 วิธีตรวจวิเคราะห์ที่นำมาใช้ทั้งเทคนิค gap-PCR และ Relative Quantitative PCR ซึ่งมีความแตกต่างกันทางเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธี gap-PCR อาศัยการสร้าง primers ให้คร่อมบริเวณ DNA ที่ขาดหายไป เมื่อนำไปทำ PCR จะสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ได้ เนื่องจากส่วนที่ขาดหายไปจะเลื่อนมา

อยู่ใกล้กัน PCR product ที่ได้นำแยกขนาดของ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน ส่วน Relative Quantitative PCR อาศัยการออกแบบ primers และ probe 3 ชุด สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA และตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α-thalassemia1 เปรียบเทียบกับยีน α-globin ที่ปกติ โดย probe ทั้ง 3 ชนิด ได้รับการออกแบบให้ติดฉลากด้วยสี Fluorescence ที่แตกต่างกัน จึงสามารถติดตามความผิดปกติของยีน α-thalassemia1 ทั้งสองชนิดได้[2]

ในการศึกษาครั้งนี้ นำเทคนิค gap-PCR มาพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจหาส่วนหายของ gene ในกลุ่ม α-thalassemia1 (SEA-deletion, THAI-deletion) ตามผู้ศึกษามาก่อน[3] มาปรับหาสภาวะที่เหมาะสมกับเครื่องมือและน้ำยาตรวจวิเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม[4] จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความถูกต้องของผลตรวจวิเคราะห์จากวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อความน่าเชื่อถือของผลตรวจวิเคราะห์ในการให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการศึกษา

ประชากรที่ศึกษา

ตัวอย่างโลหิตที่ได้รับการตรวจหา Hemoglobin typing ด้วยวิธี Low pressure Liquid chromatography ที่งานตรวจโลหิตวิทยา จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก และการตรวจพิเศษ ตั้งแต่ กันยายน พ.ศ. 2558 ถึง เมษายน พ.ศ. 2559 จำนวน 103 ราย โดยจัดกลุ่มผู้ป่วยโรค α-thalassemia กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มียีน α-thalassemia กลุ่มผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ จากผลตรวจทางโลหิตวิทยาตามแนวทางการวินิจฉัยในคู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ได้ดังนี้

1. กลุ่มผู้ป่วยโรค α-thalassemia 1 ได้แก่ Hb H disease (α-thalassemia 1/α-thalassemia 2), Hb H-CS disease (α-thalassemia 1/Hb CS), EA Bart's disease, EFA Bart's Disease, EF Bart's Disease จำนวน 8 ราย

2. กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ ได้แก่ Hb E trait Suspected Hb Constant spring จำนวน 13 ราย

3. กลุ่มผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ ได้แก่ Homozygous Hb E with or without alpha-thalassemia, Normal Hb typing not rule out alpha-thalassemia, Hb E trait with or without α-thalassemia, beta-thalassemia trait with or without alpha-thalassemia, Suspected Homozygous Hb E or Beta thalassemia/HbE with or without alpha-thalassemia, Beta-thalassemia/Hb E with or without alpha-thalassemia จำนวน 82 ราย

วิธีการศึกษา

1. วิธีพัฒนาการตรวจวิเคราะห์หา α-thalassemia 1 gene ด้วยวิธี gap-PCR (SEA, THAI)

1.1 การสกัดสารพันธุ์กรรม นำตัวอย่างโลหิตมาสกัดดีเอ็นเอ ตามชุดสกัด Quick Gene DNA Tissue kit S (Fujifilm) ร่วมเครื่องสกัดดีเอ็นเอ Quickgene 810 (Fujifilm) โดยปฏิบัติตามคู่มือที่ผู้ผลิตกำหนด ได้สารละลายดีเอ็นเอ (DNA template) นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

1.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ภาพแสดงตำแหน่งสังเคราะห์ของไพรเมอร์บนสาย DNA และผลตรวจหาขนาด DNA ของ PCR product ด้วย gel electrophoresis (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟรเมอร์ และ ขนาดของ PCR product จากกระบวนสังเคราะห์สารพันธุกรรม[3]

ไฟเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’ ----- 3’)	ขนาด PCR product (bp)
T1	TGA CTG CAT CAT AAT TCC AGC AG	480
T2	TGA GGC AGG AGA TTC GCT TGA	
A7	CTC TGT GTT CTC AGT ATT GGA G	660
A9	ATA TAT GGG TCT GGA AGT GTA TC	
A1B	GGT TCC CTG AGC CCC GAC ACG	314

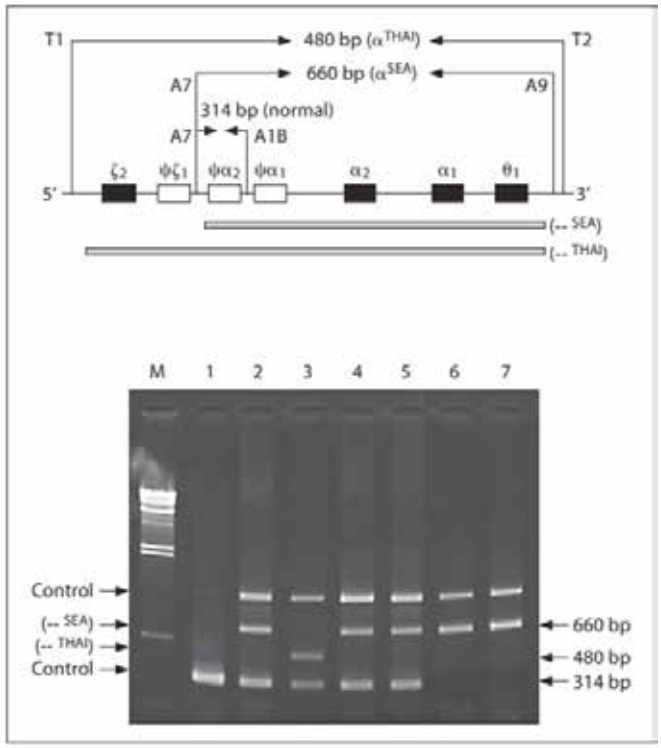


Fig. 1. The location and orientation primers used in a multiplex PCR system for simultaneous detection of the (−−^{SEA}) and the (−−^{THAI}) α^0-thalassemia. The 314-bp fragment generated from primers A7 and A1B is a normal control fragment, whereas the 660-bp fragments with primers A7 and A9 and the 480-bp fragments with primers T1 and T2 are the (−−^{SEA}) and the (−−^{THAI}) α^0-thalassemia-specific fragments, respectively. M = λ/*Hin*dIII size markers; lane 1 = normal control; lane 2 = α^0-thalassemia carriers with (−−^{SEA}) deletions; lane 3 = α^0-thalassemia carriers with (−−^{THAI}) deletions; lanes 4 and 5 = positive for α^0-thalassemia with the (−−^{SEA}) determinant; lanes 6 and 7 = subjects with Hb Bart's hydrops fetalis caused by homozygosity for α^0-thalassemia with the (−−^{SEA}) determinant.

ภาพที่ 1 *แสดงตำแหน่งสังเคราะห์ของไฟรเมอร์บนสาย DNA และผลตรวจหาขนาด DNA ของ PCR product ด้วย gel electrophoresis*[3]

1.3 การหาสภาวะเหมาะสมของเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยปรับปริมาณสารละลาย dNTP (Solis Biodyne, Estonia) DNA polymerase (Promega, USA) ไพรเมอร์ ให้เหมาะสม ตามผู้ศึกษามาก่อนและความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มปริมาณสารพันธุ์กรรมตามผู้ผลิตกำหนด นำสารละลายที่ได้ 22 ไมโครลิตร และเติม DNA template 3 ไมโครลิตร นำมาผ่านกระบวน PCR ด้วยเครื่อง thermal cycler (Labcycler SenoQuest, Germany) โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที เพื่อกระตุ้นให้ Tag polymerase พร้อมที่จะทำงาน จากนั้นเข้าสู่วงรอบเพิ่มสารพันธุ์กรรม 35 รอบ ประกอบ Denaturation 95 องศาเซลเซียส 40 วินาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 20 วินาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส 120 วินาที จากนั้น เข้าสู่ Final Extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ สิ้นสุดกระบวนการ PCR นำ PCR product ที่ได้นำแยกขนาดของ DNA ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน (HyperLadder 1kb, bioline) ที่ 100 โวลต์ นาน 45 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide บันทึกภาพผลตรวจด้วย EZ Gel Documentation System

2. ประเมินถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์

เมื่อปรับสภาวะที่เหมาะสมในวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น นำไปตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างโลหิตกลุ่มประชากรที่ศึกษา นำผลตรวจที่ได้มาคำนวณหาความไวและความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์

วิธีการเก็บข้อมูล

1. บันทึกภาพผลผลตรวจหาขนาด DNA ของ PCR product ด้วย gel electrophoresis ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์หา α-thalassemia 1 gene ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR ที่ปรับสภาวะเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ โดยตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างโลหิตที่มีผลตรวจชนิดฮีโมโกลบิน

2. ตรวจวิเคราะห์หา α-thalassemia 1 ในตัวอย่างโลหิตในกลุ่มประชากรที่ศึกษา 103 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR ที่ปรับสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ บันทึกผลการตรวจ

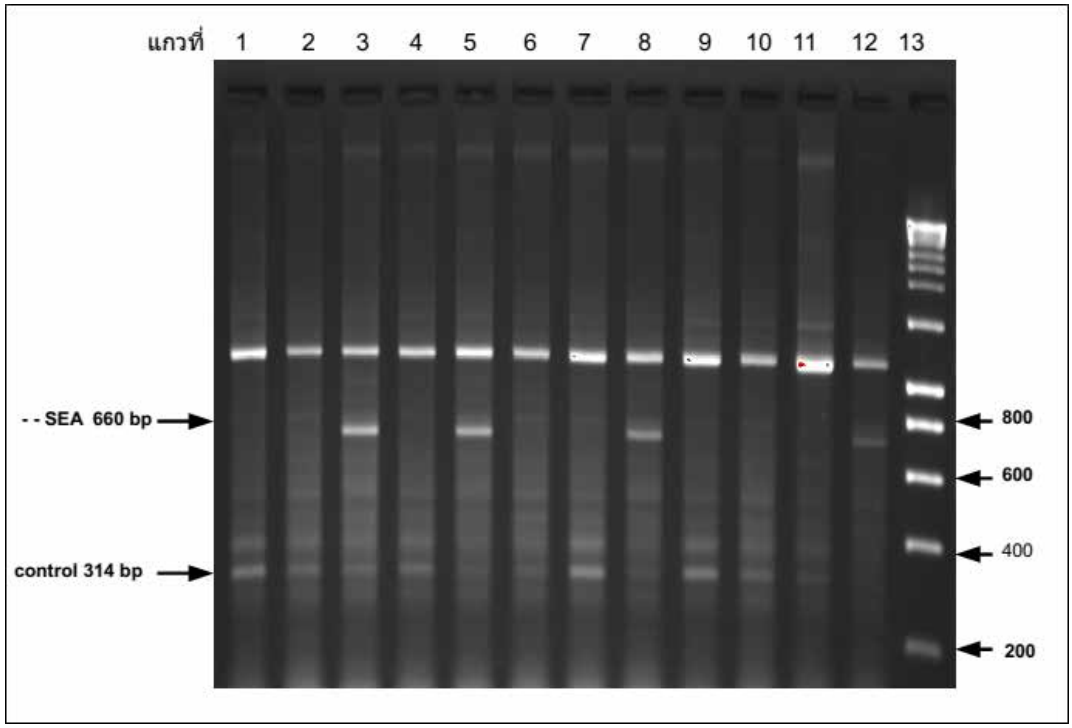
การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เปรียบเทียบผลบันทึกภาพ ผลตรวจหาขนาด DNA ของ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์หา α-thalassemia 1 gene ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR

2. คำนวณหาความไวและความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ในกลุ่มประชากรกลุ่มผู้ป่วยโรค α-thalassemia และ กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มียีน α-thalassemia ร่วมอยู่

ผลการศึกษา

ภาพผลตรวจวิเคราะห์หา α-thalassemia1 gene ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR ได้จากปรับสภาวะของสารละลายและ DNA template ให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ตัวอย่างผู้ป่วยที่มีผลตรวจหาชนิดฮีโมโกลบิน เป็น Homozygous HbE 5 ราย (แถวที่ 1, 3, 4, 7, 9) HbE Trait 1 ราย (แถวที่ 6) A2A 3 ราย (แถวที่ 2, 10, 11) A2A Bart's 3 ราย (แถวที่ 5, 8, 12) ซึ่ง A2A Bart's เป็นที่เฉพาะกับ α-thalassemia 1 ($--^{SEA}$) และ HyperLadder 1kb (แถวที่ 13) เป็นตัวกำหนดตำแหน่ง DNA ในตรวจหาขนาด DNA base pair ด้วยวิธี gel electrophoresis พบว่า แถบ DNA ที่ตำแหน่ง 314 bp เป็น internal control และ ตำแหน่งที่ 660 bp เฉพาะกับ α-thalassemia 1 ($--^{SEA}$) ซึ่งแถบ DNA ที่ตำแหน่ง 314 bp สังเคราะห์จากไพรเมอร์ A7 และ A1B, และ ตำแหน่งที่ 660 bp สังเคราะห์ของไพรเมอร์ A7 และ A9 แสดงที่ แถบที่ 1–12 และแถบที่ 3, 5, 8, 12 ตามลำดับ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 2 *แสดงผลตรวจหา α-thalassemia 1 (--^{SEA}) ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR โดยตำแหน่งที่ 314 bp สังเคราะห์จากไฟรเมอร์ A7 และ A1B เป็น Internal control, ตำแหน่งที่ 660 bp สังเคราะห์ของไฟรเมอร์ A7 และ A9 เฉพาะกับ α-thalassemia 1 (--^{SEA}), แถวที่ 1,2,4,6,7,9,10,11 ให้ผลลบกับ α-thalassemia 1 (--^{SEA}) แถวที่ 3,5,8,12 ให้ผลบวกกับ α-thalassemia 1 (--^{SEA}) แถวที่ 13 HyperLadder 1kb เป็นทราบขนาด DNA bp*

ผลตรวจตัวอย่างโลหิต จำนวน 103 ราย ได้รับจัดกลุ่มตัวอย่างโลหิตเพื่อตรวจหา α-thalassemia 1 gene พบว่า กลุ่มผู้ป่วยโรค α-thalassemia1 จำนวน 8 ราย ตรวจพบ α-thalassemia 1 (SEA deletion) ทั้งหมด คิดเป็น ร้อยละ 100 กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ จำนวน 13 ราย ตรวจไม่พบ α-thalassemia 1 (SEA, THAI deletion) ทั้งหมด คิดเป็น ร้อยละ 100 และกลุ่มผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ จำนวน 82 ราย ตรวจพบ α-thalassemia 1 (SEA deletion) จำนวน 6 ราย คิดเป็น ร้อยละ 7.3 แสดงให้เห็นว่า วิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น มีความไวในการทดสอบ ร้อยละ 100 มีความจำเพาะในการทดสอบ ร้อยละ 100 และสามารถตรวจพบยีนในกลุ่มที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ ได้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลตรวจหา α-thalassemia 1 (--^{SEA}) ด้วยวิธี Multiplex gap-PCR ในกลุ่มผู้ป่วยโรค α-thalassemia1, กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มียีน α-thalassemia, กลุ่มผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ จำนวน 103 ราย

Hemoglobin typing report	Hemoglobin typing	จำนวน	GAP PCR Result			ร้อยละผลบวก
			Negative	positive for SEA deletion	Positive for THAI delete	
1. กลุ่มผู้ป่วยโรค -thalassemia1						
Hb H disease (α-thalassemia 1/α-thalassemia 2)	A2ABart'sH	3	0	3	0	100
Hb H-CS disease (α-thalassemia 1/ Hb CS)	CS A2A Bart's H	1	0	1	0	100
EA Bart's disease	EA Bart's	1	0	1	0	100
EFA Bart's Disease	EFA Bart's	2	0	2	0	100
EF Bart's Disease	EF Bart's	1	0	1	0	100
2. กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มียีน α-thalassemia						
Hb E trait	EA (HbE 25–35%)	12	12	0	0	0
Suspected Hb Constant spring	CsA2A	1	1	0	0	0
3. กลุ่มผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่						
Normal Hb typing not rule out alpha-thalassemia	A2A	30	26	4	0	13.3
Homozygous Hb E with or without alpha-thalassemia	EE	31	30	1	0	3.2
Hb E trait with or without α-thalassemia	EA (HbE < 25 %)	14	13	1	0	7.1
Suspected Homozygous Hb E or Beta thalassemia/ HbE with or with out alpha-thalassemia	EE/EF	4	4	0	0	0
Beta-thalassemia/Hb E with or without alpha-thalassemia	EFA	2	2	0	0	0
beta-thalassemia trait with or without alpha-thalassemia	A2A (HbA2 >4%)	1	1	0	0	0

วิจารณ์และสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์หา α-thalassemia1 ด้วยวิธี Multiplex-PCR โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่มีผู้ศึกษามาก่อนได้ปรับสภาวะให้เหมาะสมในน้ำยาสารละลายเพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุ์กรรมและเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycle) และนำ PCR product ที่ได้มาแยกชนิดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำมาตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีผลตรวจหาชนิดฮีโมโกลบิน พบว่า ได้แถบ DNA ที่ตำแหน่ง 660 bp, 314 bp ตามลำดับ ซึ่งเป็นสาย DNA ที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอจาก ไพรเมอร์ A7 และ A9 ที่เฉพาะกับ α-thalassemia 1 ($--^{SEA}$) และสาย DNA ที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ A7 และ A1B เป็น Internal control ซึ่งให้ผลการทดสอบ เช่นเดียวกันกับผู้ศึกษามาก่อน ส่วนตำแหน่งที่ 480 bp ซึ่งได้จากสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไพเมอร์ T1 และ T2 เฉพาะกับ α-thalassemia 1 ($--^{Thai}$) ไม่สามารถประเมินได้ เนื่องจากไม่มีตัวอย่างทดสอบ เนื่องจากมีความชุกของความผิดปกตินี้ ร้อยละ 1 ซึ่งมีความชุกต่ำมาก อย่างไรก็ตามการให้บริการตรวจวิเคราะห์ต้องใช้ไพเมอร์ T1 และ T2 ในการตรวจวิเคราะห์หา α-thalassemia 1 ควบคู่ไปด้วย เมื่อนำมาตรวจตัวอย่างผู้ป่วย พบว่า มีความไวในการทดสอบ ร้อยละ 100 มีความจำเพาะในการทดสอบ ร้อยละ 100 ตามลำดับ และตรวจพบ α-thalassemia 1 ในกลุ่มผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ แสดงถึงความสามารถในการตรวจหายีนดังกล่าวของการทดสอบ ซึ่งแต่ละพื้นที่มีผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่แตกต่างกัน และได้สอบเทียบผลตรวจระหว่างห้องปฏิบัติการศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมา ให้ผลตรวจ α-thalassemia 1 ตรงกัน

กลุ่มประชากรที่ศึกษาเป็นตัวอย่างโลหิตอาศัยการจัดกลุ่มผู้ป่วยตามแนวทางการวินิจฉัยในคู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ซึ่งใช้ผลตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบินร่วมกับ MCV และ MCH จัดเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรค α-thalassemia 1 ซึ่งกลุ่มนี้ตรวจพบ Hb Bart's เนื่องจากฮีโมโกลบินผิดปกตินี้ที่เกิดจากการขาดหายของ α-globin gene บน chromosome คู่ที่ 16 จำนวน 2 ตำแหน่งบนเส้นเดียวกัน[4,5] ผลตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินที่พบ A2A Bart's, CS A2A Bart's H, EA Bart's, EFA Bart's, EF Bart's ซึ่งตรวจพบ α-thalassemia1 (SEA delete) ทั้งหมด และกลุ่มผู้ป่วยที่อาจจะมียีน α-thalassemia ร่วมอยู่ ตรวจพบชนิด ฮีโมโกลบิน A2A, EE, EA, HbE (<25%), EE/EF, EFA, A2A (HbA2>4%) ซึ่งตรวจพบ α-thalassemia 1 (SEA delete) ร้อยละ 7.3 ซึ่งกลุ่มนี้ตรวจพบได้สูงในกลุ่ม Normal Hb typing not rule out apha-thalassemia (A2A MCV < 80, HbE Trait with/without α-thalassemia (Hb E <25%) ร้อยละ 13.3, 7.1 ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ ณัฐยา แซ่อึ้ง และคณะ[3] ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์และวิธีตรวจวิเคราะห์เดียวกันในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ตรวจพบ α-thalassemia 1 ในกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบชนิดฮีโมโกลบินที่เหมือนกัน ส่วนกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มียีน α-thalassemia 1 ร่วมอยู่เป็นกลุ่มพบชนิดฮีโมโกลบิน EA (HbE 25–35%), CS A2A ซึ่งตรวจไม่พบ α-thalassemia1 (SEA, THAI delete) ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องคำแนะนำของคณะผู้เชี่ยวชาญได้แนะนำไว้

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีตรวจโดยอาศัยน้ำยาสำเร็จรูปในส่วนสารละลายชีวเคมีที่มีส่วนสำคัญในสร้างสารพันธุ์กรรมประกอบด้วย dATP dCTP dGTP dTTP และเอนไซน์ Taq DNA polymerase

รวมทั้งสารเคมีที่จำเป็น ได้แก่ Mg^{2+} และ Primers ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกออกแบบไว้ เพื่อสังเคราะห์สายพันธุ์กรรมเป้าหมาย ส่วนปริมาณ DNA template ได้จากการสกัด DNA จากตัวอย่าง นำมาปรับความเข้มข้นของสารละลายให้มีสภาวะที่เหมาะสมให้เกิดกระบวนเพิ่มปริมาณสารพันธุ์กรรมในหลอดทดลอง ดังนั้นต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้เป็นตามที่กำหนด[6] ต้องมีตัวอย่างที่มี α-thalassemia1 และตัวอย่างที่ไม่มี α-thalassemia1 รวมทั้ง DNA marker ที่เหมาะสมกับตำแหน่ง 314, 480, 660 bp ควบคุมทุกครั้งที่ทำการตรวจวิเคราะห์

สรุป วิธีตรวจวิเคราะห์หา α-thalassemia1 (SEA, THAI delete) ด้วยวิธี Multiplex-PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ มาปรับสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์กับ DNA template ต้นฉบับ น้ำยาเพิ่มปริมาณสารพันธุ์กรรม และกระบวน PCR ที่เหมาะสมกับเครื่อง Thermal cycle พบว่า มีความไวและความจำเฉพาะของการตรวจวิเคราะห์ร้อยละ 100 ให้ผลตรวจสอดคล้องกับผู้ทำศึกษามาก่อนที่ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ วิธีตรวจเดียวกัน และเปรียบเทียบผลตรวจระหว่างห้องปฏิบัติการ ให้ผลตรวจตรงกัน ดังนั้นวิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ผลตรวจที่มีความน่าเชื่อถือจึงสามารถให้บริการตรวจวิเคราะห์ได้ และเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการทางอณูโมเลกุล

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณ รศ.ดร.สุพรรณ ฟู่เจริญ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้คำแนะนำลำดับนิวคลีโอไทด์และการใช้ไฟเมอร์ ดร.ยุพิน โจ้แป้ง นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ ศูนย์อนามัยที่ 9 นครราชสีมา ที่ให้การสอบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ และนักเทคนิคการแพทย์ เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์ งานโลหิตวิทยา จุลทรรศน์คลินิก และการตรวจพิเศษ ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างโลหิตในการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการจัดทำคู่มือการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน. คู่มือการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน. นนทบุรี:ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ; 2553.
2. คณะกรรมการจัดทำคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ.คู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ. นนทบุรี : ศูนย์วิจัยทางคลินิกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2552.
3. Sae-ung N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. α^0-Thalassemia and Related Disorders in Northeast Thailand : Molecular and Hematological Characterization Acta Haematol 2007;117:78–82.
4. กิตติ ต่อจรัส. Molecular Basis of Thalassemia and Hemoglobin Disorder. เวชแพทย์ทหารบก 2556 ; 1: 35-40.
5. Harteveld CL, Higgs DR. α-thalassaemia. OJRD 2010;5:13.
6. จริยา ชมวารินทร์. Theories and Principles of PCR .ใน : PCR Technology and Applications. ขอนแก่น : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2540; หน้า 3-15.