วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ ๑๘ ฉบับที่ ๓ พฤษภาคม - มิถุนายน ๒๕๕๒

Journal of Health Science
Vol. 18 No. 3 May - June 2009

Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 แบบรวมตัวอย่างโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์

วิภาวดี เจียรกุล
จันทร์ฉาย คำแสน
กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุบลราชธานี

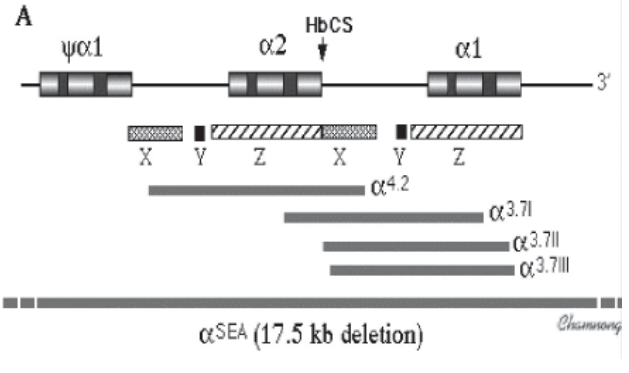
บทคัดย่อ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 เป็นโรคพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปรกติจากการสร้างสายแอลฟาโกลบินยีนจะทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง ซึ่งมี 2 ชนิด คือ SEA และ THAI อุบัติการพบประมาณร้อยละ 5 การตรวจวิเคราะห์ยีนแอลฟาธาลัสซีเมียโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ โดยสร้างไพรเมอร์ให้คร่อมรอยต่อของยีน ที่ขาดหายนั้น แล้วนำผลพีซีอาร์ที่ได้มาวิ่งในสนามไฟฟ้าบนแผ่นวุ้นอะกาโรส และย้อมด้วยสารเอทธิเดียมโบรไมด์ นั้นมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุบลราชธานี จึงได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์โดยรวมตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่า ทั้งตัวอย่างชนิด SEA, THAI และรวมทั้ง SEA และ THAI มีความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ร้อยละ 100 เมื่อเจือจางตัวอย่างที่ 1:10 สำหรับปริมาณตัวอย่างบวกน้อยสุดที่ยังคงตรวจวิเคราะห์ได้ ในตัวอย่างชนิด SEA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1:100 และในตัวอย่างชนิด THAI คือ 1:40 ดังนั้นการพัฒนาการเทคนิคโดยรวมตัวอย่างจะช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจวิเคราะห์แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 โดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ได้

คำสำคัญ: **แอลฟาธาลัสซีเมีย 1, SEA type, THAI type, การรวมตัวอย่าง, มัลติเพล็กพีซีอาร์**

บทนำ

แอลฟาธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไป เป็นท่อนยาวหลายกิโลเบส (large deletion) ทำให้การสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย ความรุนแรงที่เกิด จะขึ้นอยู่กับจำนวนยีนแอลฟาโกลบินที่ขาดหายไป แอลฟาธาลัสซีเมียแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ 1. แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α-thalassemia 1) หรือแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมีย (α°-thalassemia) โดยแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียจะไม่มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินเลย ส่วนใหญ่เกิดจากยีนแอลฟาทั้ง 2 โลไซ (loci) ขาดหายไป แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ที่พบบ่อยในเอเชียอาคเนย์ รวมทั้งในประเทศไทยคือ ชนิด SEA (Southeast Asia type) เกิดจากยีนขาดหายไปประมาณ 19 กิโลเบส และชนิดที่พบบ่อยแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนี่ยนคือ ชนิด Med (Mediterranean type) มียีนขาดหายไปประมาณ 18 กิโลเบส มีชนิด

อื่น ๆ ที่พบไม่บ่อยอีกประมาณ 10 ชนิด เช่น ชนิด Thai (Thai type) มีรายงานในคนไทยหลายครอบครัว เกิดจากยีนขาดหายไปยาวประมาณ 34 กิโลเบส[1] โฮโมไซโกต (homozygote) ของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (--/--) จะไม่สามารถสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินได้เลย ทำให้เกิดโรคทารกบวมน้ำชนิดมีฮีโมโกลบินบาร์ท (Hb Bart's hydrops fetalis) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงที่สุด ทารกที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดนี้จะเสียชีวิตทั้งหมด อาจเสียชีวิตก่อนหรือหลังคลอดภายใน 24 ชั่วโมง 2. แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α-thalassemia 2) หรือ แอลฟา-บวกธาลัสซีเมีย (α^+-thalassemia) แอลฟาธาลัสซีเมียชนิดนี้สามารถสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินได้ แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าปรกติ มีอาการรุนแรงน้อยกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ความผิดปรกติส่วนใหญ่เกิดจากบางส่วนของยีนขาดหายไป เหลือยีนแอลฟาโกลบินเพียงยีนเดียวที่ทำหน้าที่ ชนิดที่พบบ่อยคือชนิดยีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ($\alpha^{3.7}$) และ 4.2 กิโลเบส ($\alpha^{4.2}$) (1) แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 นี้พบได้บ่อยกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 สำหรับแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 นอกจากจะเกิดจากยีนขาดหายแล้ว ยังมีอีกหลายชนิดที่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation)[2-4] ชนิดที่พบบ่อยคือฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb Constant Spring, Hb CS) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปรกติที่เกิดจากการแทนที่เบส (base substitution) 1 ตัว ที่โคดอนหยุด (stop codon) คือเบส U เปลี่ยนเป็น C ทำให้โคดอนหยุดเลื่อนถัดไปอีก 31 โคดอน สายโปรตีนแอลฟาโกลบินที่สร้างได้จึงยาวกว่าปรกติและไม่เสถียร เฮเตอโรไซโกตเชิงซ้อน (compound heterozygote) ของแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (--/-α) ทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอ็ช (Hb H diseases) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงปานกลาง (thalassemia intermedia)



รูปที่ 1 ตัวอย่างตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบิน ที่พบในประเทศไทย

ตารางที่ 1 จีโนทัยป์ของแอลฟาธาลัสซีเมีย

α-Thalassemia	Genotype
Normal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
α-thal 2 trait	$-\alpha/\alpha\alpha$, $\alpha^{cs}\alpha/\alpha\alpha$
α-thal 1 trait	$--/\alpha\alpha$, $-\alpha^{cs}/\alpha\alpha$
HbH disease (HbH = β_4)	$--/-\alpha$, $--/\alpha^{cs}\alpha$
HbBart's Hydrop fetalis (HbBart's = γ_4)	--/--

ภาวะธาลัสซีเมียพบมากในประเทศไทย และพบได้ทั่วโลก ภาวะธาลัสซีเมียที่พบในบางประเทศเกือบทั้งหมด เป็นแบบเดียวกัน แต่ในประเทศไทยมีความหลากหลายมาก จากการสำรวจ ภาวะธาลัสซีเมียในประเทศไทยสามารถแบ่งเป็นพวกใหญ่ ๆ ที่สำคัญ 2 พวก คือ[5-7]

พวกที่ 1 - แอลฟ่า-ธาลัสซีเมีย พบมากได้แก่

- พาหะของแอลฟ่า-ธาลัสซีเมีย 1 พบประมาณร้อยละ 5
- พาหะของแอลฟ่า-ธาลัสซีเมีย 2 พบประมาณร้อยละ 16
- พาหะของฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง พบประมาณร้อยละ 4

พวกที่ 2 - เบต้า-ธาลัสซีเมีย

- พาหะของเบต้า-ธาลัสซีเมีย พบประมาณร้อยละ 5
- พาหะของฮีโมโกลบินอี พบประมาณร้อยละ 13

ข้อมูลข้างบนนี้เป็นภาพรวมอัตราเฉลี่ยของประเทศ การสำรวจในแต่ละภาค จะได้ค่าแตกต่างกันออกไปบ้าง ในภาคเหนือ พบแอลฟ่า-ธาลัสซีเมียมาก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบฮีโมโกลบินอีมาก เช่น ในจังหวัดสุรินทร์ สกลนคร พบถึงร้อยละ 50-60 ของประชากร กล่าวได้ว่า โดยเฉลี่ยชาวไทยเป็นพาหะของธาลัสซีเมียชนิดใดชนิดหนึ่ง ถึงร้อยละ 30-40 หรือประมาณ 20 ล้านคน เมื่อพาหะสมรสกัน และเป็นชนิดที่เป็นพวกเดียวกัน อาจมีลูกเป็นโรคได้ พบว่าในประเทศไทยมีคนเป็นโรคธาลัสซีเมียมาก ถึงร้อยละ 1 หรือประมาณ 6 แสนคน

จากข้อมูลอุบัติการแอลฟาธลัสซีเมียค่อนข้างต่ำ และการตรวจยืนยันแอลฟาธาลัสซีเมีย โดยวิธีมัลติ-เพล็กพีซีอาร์ก็มีค่าใช้จ่ายสูง กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุบลราชธานี จึงทำการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งมีวัตถุประสงค์พัฒนาวิธีในการรวมตัวอย่างเพื่อลดค่าใช้จ่าย และเวลาในการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าว

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดคู่สมรสที่ส่งมาตรวจ ณ กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุบลราชธานี ในช่วงเดือนมิถุนายน 2550 ถึงเดือนเมษายน 2551 จำนวน 57 ราย โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำต้นแขน ปริมาตรประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ใส่หลอดพลาสติกปลอดเชื้อที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เก็บไว้ในที่ 4°C ตัวอย่างเลือดทั้ง 57 ราย มีรายละเอียดดังนี้

1.1 ให้ผลลบในการตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ทั้งชนิด SEA และ THAI จำนวน 50 ตัวอย่าง

1.2 ให้ผลบวกในการตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ชนิด SEA จำนวน 5 ตัวอย่าง

1.3 ให้ผลบวกในการตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ชนิด THAI จำนวน 2 ตัวอย่าง

2. การเตรียมตัวอย่างเลือด

2.1 เจือจางตัวอย่างเลือดเพื่อความถูกต้อง และแม่นยำของวิธี

2.1.1 ตัวอย่างชนิด SEA เจือจาง 1:10 โดยปิเปตตัวอย่างชนิด SEA 20 ไมโครลิตร รวมกับตัวอย่างผลลบ จำนวน 180 ไมโครลิตร

2.1.2 ตัวอย่างชนิด THAI เจือจาง 1:10 โดยปิเปตตัวอย่างชนิด THAI 20 ไมโครลิตร รวมกับตัวอย่างผลลบ จำนวน 180 ไมโครลิตร

2.1.3 ตัวอย่างชนิด SEA+THAI เจือจาง 1:10 โดยปิเปตตัวอย่างชนิด SEA 20 ไมโครลิตร ตัวอย่างชนิด THAI 20 ไมโครลิตร รวมกับตัวอย่างผลลบ จำนวน 160 ไมโครลิตร

2.2 เจือจางตัวอย่างเลือดเพื่อหาปริมาณตัวอย่างน้อยสุดที่ยังคงตรวจวิเคราะห์ได้

2.2.1 หาปริมาณตัวอย่างชนิด SEA น้อยสุดที่ยังคงตรวจวิเคราะห์ได้ โดยเจือจางตัวอย่างชนิด SEA ด้วยตัวอย่างลบ ที่อัตราการเจือจาง 1:10, 1:20, 1:30,...,1:100

2.2.2 หาปริมาณตัวอย่างชนิด THAI น้อยสุดที่ยังคงตรวจวิเคราะห์ได้ โดยเจือจางตัวอย่างชนิด

ตารางที่ 2 การเจือจางตัวอย่างเลือดเพื่อหาปริมาณตัวอย่างน้อยสุดที่ยังคงตรวจวิเคราะห์ได้

หาปริมาณตัวอย่างน้อยที่สุดที่ตรวจได้		อัตราการเจือจาง									
		1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80	1:90	1:100
ปริมาตรตัวอย่าง/ไมโครลิตร	SEA หรือ THAI	20	10	6.7	5	4	3.3	2.9	2.5	2.2	2
	ตัวอย่างลบ	180	190	193.3	195	196	196.7	197.1	197.5	197.8	198

THAI ด้วยตัวอย่างลบ ที่อัตราการเจือจาง 1:10, 1:20, 1:30,...,1:100

3. วิธีการศึกษา

3.1 ตัวอย่างเลือดที่เตรียมไว้แล้วนำมาแยกดีเอ็นเอด้วยวิธี Spin column extraction ด้วยชุดน้ำยา QIAamp DNA Minikit (QIAGEN Gmbh, Germany) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

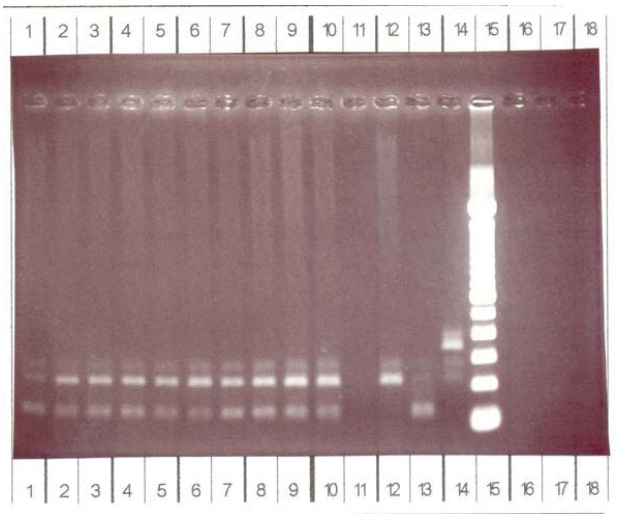
3.2 การตรวจยืนยันแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ใช้เทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์[8-9] คือ การทำพีซีอาร์โดยใช้ primer หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อเพิ่มขยายหลาย Target DNA จำนวน 40 รอบ ตรวจหาแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ทั้งชนิด SEA และ THAI ให้ชนิดส่วนดีเอ็นเอขนาด 119 และ 357 เบส ตามลำดับโดยมี SEA Normal ให้ชนิดส่วนดีเอ็นเอขนาด 214 เบส เป็นตัวควบคุมภายในปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปทำ Agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide ส่องดูด้วยแสง UV และถ่ายภาพ

ผลการศึกษา

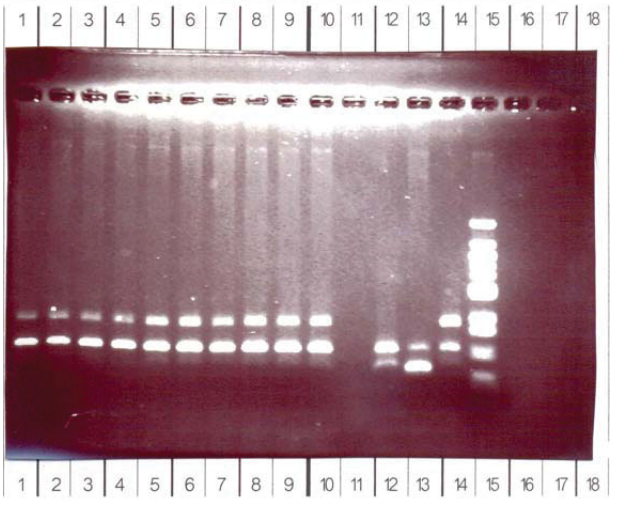
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเบื้องต้นของความเป็นไปได้ในการรวมตัวอย่าง ทั้งชนิด SEA และTHAI โดยเจือจางตัวอย่างที่ 1:1, 1:2, 1:3,...,1:10 ยังคงให้ผลบวกที่ชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3

จากการศึกษาตัวอย่างชนิด SEA ในการหาความถูกต้องแม่นยำของวิธี โดยเจือจางตัวอย่างชนิด SEA ที่ 1:10 ด้วยตัวอย่างลบ เจือจาง 10 ซ้ำ (10 ตัวอย่าง) แต่ละตัวอย่างนำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำมัลติเพล็กพีซีอาร์ ได้ความถูกต้องแม่นยำร้อยละ 100 (ผลชนิด SEA บวกทุกตัวอย่าง) ดังแสดงในรูปที่ 4

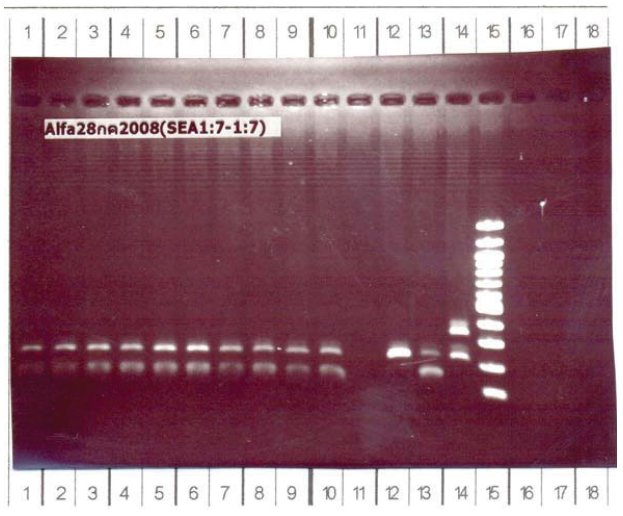
จากการศึกษาตัวอย่างชนิด THAI ในการหาความถูกต้องแม่นยำของวิธี โดยเจือจางตัวอย่างชนิด THAI ที่ 1:10 ด้วยตัวอย่างลบ เจือจาง 10 ซ้ำ (10 ตัวอย่าง) แต่ละตัวอย่างนำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำมัลติเพล็กพีซีอาร์ ได้ความถูกต้องแม่นยำร้อยละ 100 (ผลชนิด THAI บวกทุกตัวอย่าง) ดังแสดงในรูปที่ 5



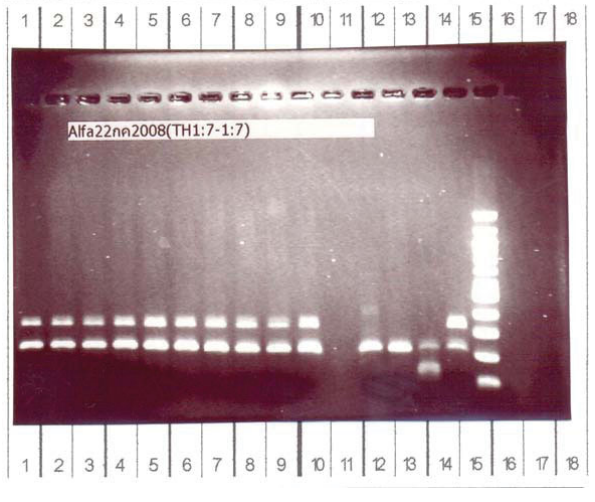
รูปที่ 2 การศึกษาเบื้องต้นแสดงการเจือจางตัวอย่าง ชนิด SEA ในเลนที่ 1-10 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:1, 1:2, 1:3,...และ1:10 ตามลำดับ เลนที่ 11 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 12 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ที่ 214 เบส เลนที่ 13 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 14 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบส เลนที่ 15 เป็น Marker ขนาด 100 เบส



รูปที่ 3 การศึกษาเบื้องต้นแสดงการเจือจางตัวอย่าง ชนิด THAI ในเลนที่ 1-10 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:1, 1:2, 1:3,...และ1:10 ตามลำดับ เลนที่ 11 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 12 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ที่ 214 เบส เลนที่ 13 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 14 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบส เลนที่ 15 เป็น Marker ขนาด 100 เบส



รูปที่ 4 การหาความถูกต้องของวิธี โดยเจือจางตัวอย่าง ชนิด SEA ในเลนที่ 1-10 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:10 เลนที่ 11 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 12 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ที่ 214 เบส เลนที่ 13 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 14 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบส เลนที่ 15 เป็น Marker ขนาด 100 เบส

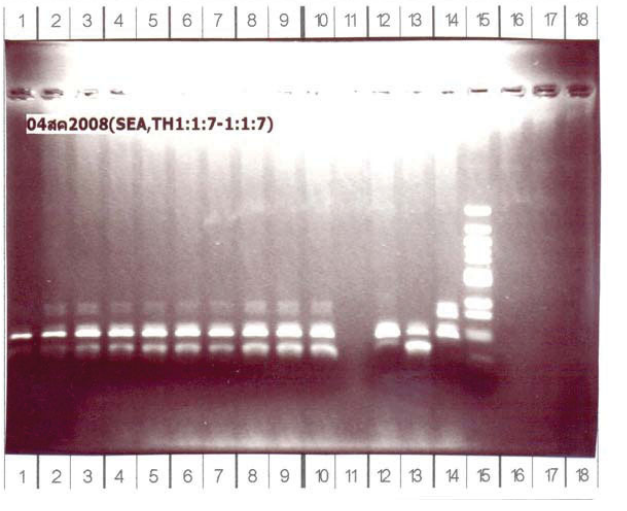


รูปที่ 5 การหาความถูกต้องแม่นยำของวิธี โดยเจือจางตัวอย่างชนิด THAI ในเลนที่ 1-10 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:10 เลนที่ 11 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 12 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ที่ 214 เบส เลนที่ 13 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 14 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบส เลนที่ 15 เป็น Marker ขนาด 100 เบส

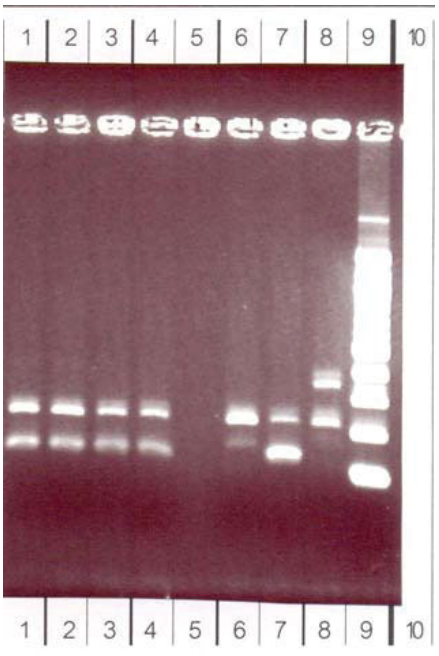
จากการศึกษาตัวอย่างรวมทั้งชนิด SEA และ THAI ในการหาความถูกต้องของวิธี โดยเจือจางตัวอย่างชนิด SEA และ THAI ที่ 1:1:8 ด้วยตัวอย่างลบ เจือจาง 10 ซ้ำ (10 ตัวอย่าง) แต่ละตัวอย่างนำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำมัลติเพล็กพีซีอาร์ได้ความถูกต้องร้อยละ 100 (ผลชนิด SEA และ THAI บวกทุกตัวอย่าง) ดังแสดงในรูปที่ 6

จากการศึกษาตัวอย่างชนิด SEA ในการหาปริมาณตัวอย่างที่บวกน้อยที่สุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ โดยเจือจางตัวอย่างชนิด SEA ด้วยตัวอย่างลบ ที่ 1:10, 1:20,1:30,..., 1:100 แต่ละการเจือจางนำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำมัลติเพล็กพีซีอาร์ ให้ผลบวกได้ถึงการเจือจางที่ 1:100 ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8

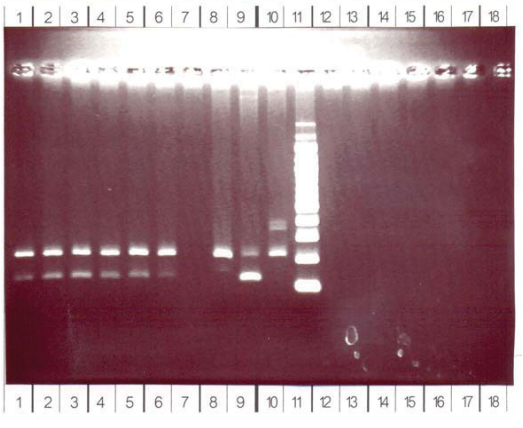
จากการศึกษาตัวอย่างชนิด THAI ในการหาปริมาณตัวอย่างที่บวกน้อยที่สุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ โดยเจือจางตัวอย่างชนิด THAI ด้วยตัวอย่างลบ ที่ 1:10, 1:20,1:30,..., 1:100 แต่ละการเจือจางนำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำมัลติเพล็กพีซีอาร์ ให้ผลบวกได้ถึงการเจือจางที่



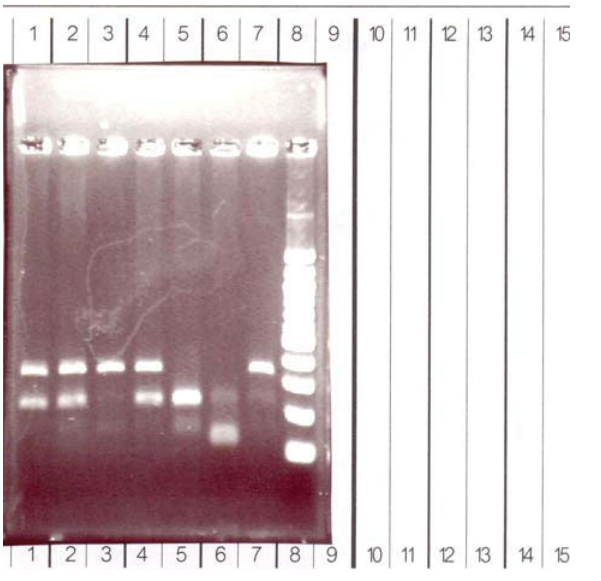
รูปที่ 6 การหาความถูกต้องแม่นยำของวิธี โดยเจือจางตัวอย่างรวมทั้งชนิด SEA และ THAI ในเลนที่ 1-10 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:1:8 เลนที่ 11 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 12 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ที่ 214 เบส เลนที่ 13 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 14 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบส เลนที่ 15 เป็น Marker ขนาด 100 เบส



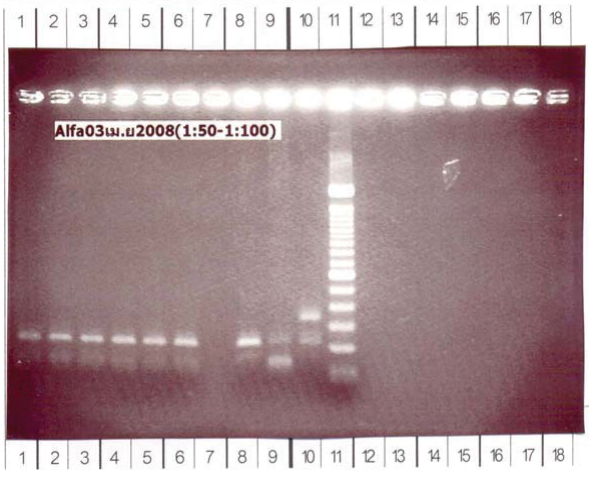
รูปที่ 7 การหาปริมาณตัวอย่างที่บวกน้อยที่สุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ของตัวอย่างชนิด SEA ในเลนที่ 1-4 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:10-1:40 เลนที่ 5 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 6 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ที่ 214 เบส เลนที่ 7 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 8 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบสเลนที่ 9 เป็น Marker ขนาด 100 เบส



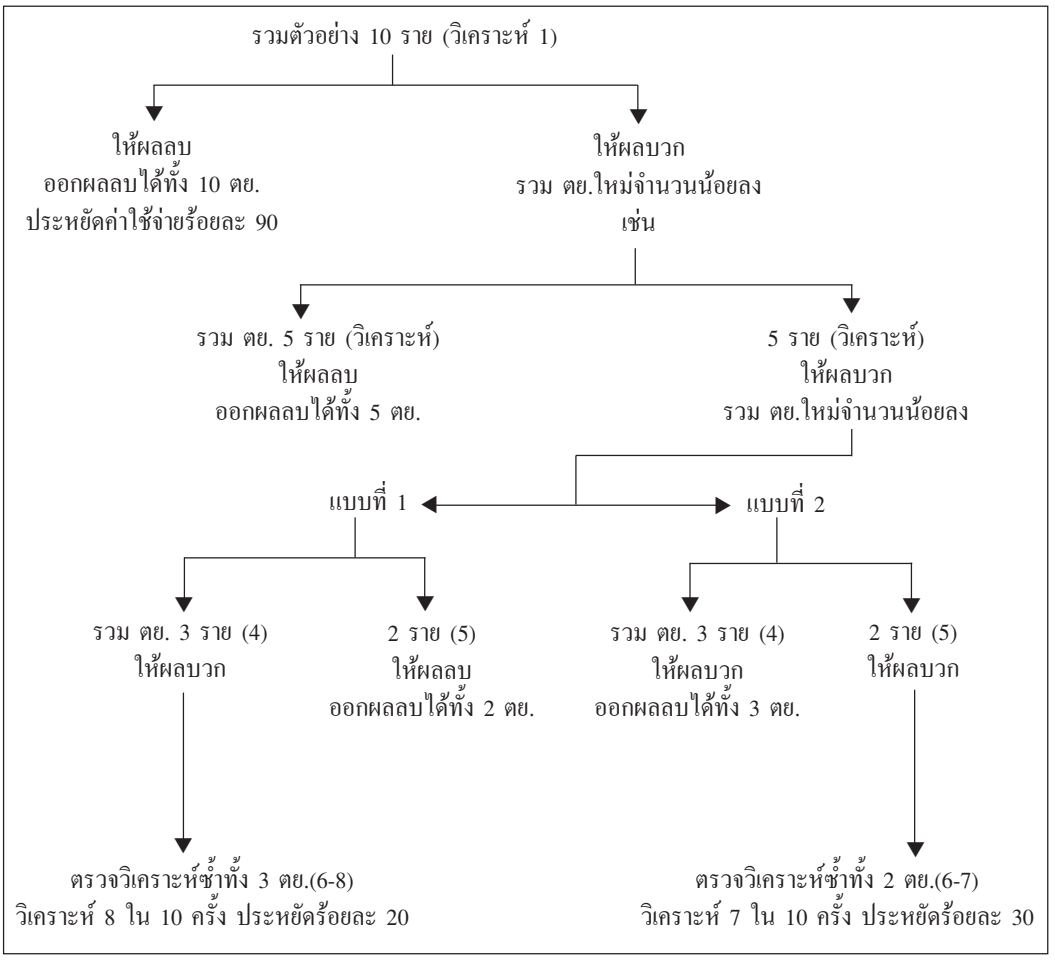
รูปที่ 8 การหาปริมาณตัวอย่างที่บวกน้อยที่สุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ของตัวอย่างชนิด SEA ในเลนที่ 1-6 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:50-1:100 เลนที่ 7 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 8 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ที่ 214 เบส เลนที่ 9 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 10 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบส เลนที่ 11 เป็น Marker ขนาด 100 เบส



รูปที่ 9 การหาปริมาณตัวอย่างที่บวกน้อยที่สุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ของตัวอย่างชนิด THAI ในเลนที่ 1-4 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:10-1:40 เลนที่ 5 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 6 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา ที่ 214 เบส เลนที่ 7 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 8 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบสเลนที่ 9 เป็น Marker ขนาด 100 เบส



รูปที่ 10 การหาปริมาณตัวอย่างที่บวกน้อยที่สุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ของตัวอย่างชนิด THAI ในเลนที่ 1-4 เป็นการเจือจางตัวอย่างที่ 1:50-1:100 เลนที่ 7 เป็นน้ำกลั่น เลนที่ 8 เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา 214 เบส เลนที่ 9 เป็นตัวควบคุมชนิด SEA ที่ 119 เบส เลนที่ 10 เป็นตัวควบคุมชนิด THAI ที่ 357 เบส เลนที่ 11 เป็น Marker ขนาด 100 เบส



รูปที่ 11 ตัวอย่างขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ การรวม 10 ตัวอย่าง ที่มี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ค่าใช้จ่ายที่ลดลง ในการรวม 10, 20 และ 30 ตัวอย่าง กรณีที่ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลลบหรือมีผลบวก 1 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างที่รวม	จำนวนครั้งที่ต้องตรวจวิเคราะห์	ประหยัดค่าใช้จ่ายร้อยละ
10 ตัวอย่าง		
ให้ผลลบ	1	90
ให้ผลบวก (มี 1 ตย.)	7-8	20-30
20 ตัวอย่าง		
ให้ผลลบ	1	95
ให้ผลบวก (มี 1 ตย.)	9-10	50-55
30 ตัวอย่าง		
ให้ผลลบ	1	96.7
ให้ผลบวก (มี 1 ตย.)	9-12	60-70

1:40 ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10

วิจารณ์

เนื่องจากธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรม และในปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่รักษาให้หายขาดได้ นอกจากการปลูกถ่ายไขกระดูก การรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นการรักษาตามอาการ และรักษาภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ตลอดอายุขัยของผู้ป่วย ซึ่งต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงและได้ผลจำกัด แนวทางแก้ไขที่ดีที่สุดและเป็นที่ยอมรับในหลายประเทศทั้งในเอเชียและในยุโรป คือ การป้องกันไม่ให้มีทารกเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมีย ขั้นตอนสำคัญในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียคือ การให้ความรู้และคำแนะนำที่ถูกต้องเกี่ยวกับธาลัสซีเมีย (counseling) การตรวจกรองและการตรวจวินิจฉัยพาหะเพื่อหาคู่สามีภรรยาที่มีโอกาสมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง และการให้บริการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ (prenatal diagnosis)

อุบัติการแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 พบเพียงร้อยละ 5[5-7] จากการศึกษาของอดิชัย และคณะ[10] รายงานอุบัติการณ์แอลฟาธาลัสซีเมียในคู่สมรสที่ส่งตรวจที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุบลราชธานีชนิด SEA พบร้อยละ 4.42 (118 ใน 4,249 ราย) และ ชนิด THAI พบร้อยละ 0.05 (2 ใน 4,249 ราย) ขณะที่ฮีโมโกลบิน A_2A (ฮีโมโกลบิน A_2 น้อยกว่า 4.0) ที่มียีนแฝงแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ศึกษาที่โรงพยาบาลยโสธรพบร้อยละ 17[11] และฮีโมโกลบิน EA (ฮีโมโกลบิน A_2 มากกว่า 10.0) ที่มียีนแฝงแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ศึกษาที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ชลบุรีพบร้อยละ 19.72[12]

การศึกษาครั้งนี้จะดูความเป็นไปได้ในการรวมตัวอย่างจากข้อมูลอุบัติการณ์ที่ต่าง ๆ ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ โดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ซึ่งจะช่วยในการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้ ค่าตรวจยืนยันแอลฟาธาลัสซีเมีย 500 บาทต่อ 1 ตัวอย่าง หากรวม 10 ตัวอย่างเป็น 1 ตัวอย่าง ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ก็จะสามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ หากตัวอย่างที่รวมนั้นให้ผลลบ ก็จะสามารถออกผลตรวจวิเคราะห์เป็นลบได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง หากตัวอย่างที่รวมนั้นให้ผลบวกชนิด SEA หรือ THAI หรือทั้ง SEA และ THAI ก็ต้องนำ 10 มารวมใหม่ให้จำนวนตัวอย่างน้อยลง เช่น แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัวอย่าง หากตัวอย่างที่รวมนั้นให้ผลลบ ก็จะสามารถออกผลตรวจวิเคราะห์เป็นลบได้ทั้ง 5 อีก 5 ตัวอย่างที่ที่เหลือต้องแบ่งกลุ่มใหม่ กรณีที่ใน 10 ตัวอย่างที่รวม มีตัวอย่างที่บวก 1 ราย จะลดค่าตรวจวิเคราะห์ได้ 20-30 เปอร์เซ็นต์ จ่ายค่าตรวจ 3,500-4,000 บาท จากเดิม 5,000 บาท หากรวมตัวอย่างจำนวนมากขึ้นก็จะลดค่าใช้จ่ายได้มากขึ้น ทั้งนี้ความเหมาะสมของจำนวนตัวอย่างที่รวมขึ้นกับความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียในพื้นที่นั้น ๆ สรุปได้ดังรูปที่ 11 และตารางที่ 3

ในปัจจุบันการรวมตัวอย่างก่อนที่จะนำมาตรวจวิเคราะห์เพื่อลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจวิเคราะห์พบได้ในการตรวจกรองผู้บริจาคโลหิต ในรายการตรวจวิเคราะห์ HIV antigen, HCV หรือในโรคที่มีความชุกต่ำ[13-16]

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียในเขตภาคอีสานตอนล่าง (จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ อำนาจเจริญ และยโสธร) ค่อนข้างต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ชนิดTHAI ซึ่งทำให้ใช้เวลาในการค้นหาตัวอย่างและเก็บตัวอย่างไว้รอศึกษาเป็นเวลานาน (มากกว่า 6 เดือน) อาจจะทำให้สารพันธุกรรมเสื่อมสภาพลงบ้าง

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ทั้งตัวอย่างชนิด SEA, THAI และการรวมตัวอย่างทั้งชนิด SEA และ THAI มีถูกต้อง ในการตรวจวิเคราะห์ร้อยละ 100 เมื่อเจือจางตัวอย่างที่ 1:10 สำหรับปริมาณตัวอย่างบวกน้อยสุดที่ยังคงตรวจวิเคราะห์ได้ ในตัวอย่างชนิด SEA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1:100 และในตัวอย่างชนิด THAI คือ 1:40 การรวมตัวอย่างเพื่อตรวจยืนยันแอลฟาธาลัสซีเมียซึ่ง

จะมีทั้งได้ชนิด SEA และTHAI ต้องดูค่าอุบัติการณ์สูงสุดของแต่ละพื้นที่ ถ้าดูข้อมูลของทั้งประเทศและในเขตภาคอีสานตอนล่าง พบประมาณร้อยละ 5 ดังนั้นสามารถรวมตัวอย่างได้ถึง 20 ตัวอย่าง ซึ่งหากมีตัวอย่างบวก 1 รายใน 20 ตัวอย่างนั้น ช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการตรวจวิเคราะห์แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 โดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ได้อย่างน้อยร้อยละ 50 ซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้ในการตรวจกรองคู่สมรสที่มีโอกาสเสี่ยงที่จะมีบุตรที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เภสัชกรวรวิทย์ กิตติวงศ์สุนทร ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุบลราชธานี ที่สนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณฝ่ายโลหิตวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขที่สนับสนุนน้ำยา ขอขอบคุณคุณพงษ์ โภคสวัสดิ์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุบลราชธานี ที่ให้คำแนะนำ และขอขอบคุณ แพทย์ พยาบาล เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในเขตสาธารณสุขที่ 14 ที่กรุณาเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. จำนงค์ นพรัตน์. การตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียทางอณูวิทยา. วารสารคณะแพทยศาสตร์สงขลานครินทร์ 2541; 16(3):145-59.
2. ปราณี ฟู่เจริญ, สุทัศน์ ฟู่เจริญ. Molecular biology of thalassemia and abnormal hemaglobins. ใน: ปราณี ฟู่เจริญ, สุทัศน์ ฟู่เจริญ, บรรณาธิการ. Thalassemia: from molecular biology to clinical medicine. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล; 2541. หน้า 6.1-6.22.
3. สุทัศน์ ฟู่เจริญ, ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ. Thalassemia and hemoglobinopathy. ใน: ถนอมศรี ศรีชัยกุล, แสงสุรีย์ จุฑา. บรรณาธิการ. ตำราโลหิตวิทยา การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ที.พี. พรินทร์; 2537. หน้า 202-42.
4. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia: molecular biology and clinical medicine. Hemoglobin 1997; 21:299-319.
5. วรวรรณ ตันไพจิตร. โรคเลือดจางธาลัสซีเมีย. 2006 [cited 2008 Aug 11]. Available from: URL: http://www.dmsc.moph.go.th/webrOOt/ri/ Npublic/p04.htm11August2008
6. เพ็ญพรรณ ตั้นสุวรรณ, วนิดา เชื้อศุภโรบล. การศึกษาความชุกของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียและภาวะพาหะในสตรีตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ โรงพยาบาลยโสธร ปีงบประมาณ 2539-2541. ยโสธรเวชสาร 2542; 1(2):119-30.
7. พิทักษ์ พฤติสุนทร. อุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียของผู้ป่วยโรงพยาบาลสมเด็จ ณ ศรีราชา. วารสารเทคนิคการแพทย์จุฬา 2539; 9:1516-23.
8. สมชาย แสงกิจพร, สิริภากร แสงกิจพร, อารีรัตน์ สังข์น้อย, ปริศนา เจริญพร. การตรวจวินิจฉัยอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิด Southeast Asia และชนิดไทย โดยเทคนิค Multiplex PCR. นนทบุรี: ฝ่ายโลหิตวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2545.
9. ปริศนา เจริญพร, สิริภากร แสงกิจพร, ปานทิพย์ นันทนาวุฒิ, ขวัญใจ วังคะฮาต, บุญนิภา สงคราม, สมชาย แสงกิจพร. การทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัย α-thalassemia 1 โดยเทคนิค Multiplex PCR. บทคัดย่อในการประชุมวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 9; 18-19 มิถุนายน 2546; ณ โรงแรมเรดิสัน. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข; 2546.
10. อดิชัย แสนทวีสุข, วิภาวดี เจียรกุล. การตรวจวิเคราะห์พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียในปี 2549-2550. บทคัดย่อในการประชุมวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 15; 27-29 สิงหาคม 2550; ณ อาคารอิมแพคคอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ อิมแพค เมืองทองธานี นนทบุรี.
11. เพ็ญพรรณ ตั้นสุวรรณ, วนิดา เชื้อศุภโรบล. การศึกษาความชุกของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียและภาวะพาหะในสตรีตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ โรงพยาบาลยโสธร ปีงบประมาณ 2539-2541. ยโสธรเวชสาร 2542; 1(2):119-30.
12. วรางคณา อ่อนทรวง, ปฐธนวรรณ ลิ้มสกุลศิริรัตน์, วรนัตร พิรุณรักษ์. พาหะของฮีโมโกลบินอีที่มียีนแฝงแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิดเอเชียตะวันออกเฉียงใต้. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2547; 1:107-13.
13. García Z, Taylor L, Ruano A, Pavón L, Ayerdis E, Ronald B, et al. Evaluation of a pooling method for routine anti-HCV screening of blood donors to lower the cost burden on blood banks in countries under development. J Med Virol 1996; 49:81-7.
14. Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, Zeger S, Quin TC. Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. J Clin Microbiol 1989; 27(7):1449-52.
15. Lan SJ, Hsieh CC, Yen YY. Pooling strategies for screening blood in areas with low prevalence of HIV. Trans Med Bull 1999; 1(4):136-45.
16. Saldanha J, Minor P. A sensitive PCR method for detecting HCV RNA in plasma pools, blood products, and single donations. J Med Virol 1994; 43:72-6.

Abstract **Development of Multiplex PCR Detection by Pooled Sample in Alpha-thalassemia 1**
Wipavadee Jearakul, Junchay Khamsaen
Regional Medical Science Center, Ubon Ratchathani
Journal of Health Science **2009; 18:445-54.**

Alpha-thalassemia 1 is a genetic disorder with imbalanced globin gene synthesis which leads to anemia. The prevalence of two types of alpha-thalassemia in Thailand (SEA and THAI) found approximately five percent. Molecular detection of alpha-thalassemia can be made by multiplex polymerase chain reaction (PCR) using primers adjacent to the deletion breakpoint and visualization of the amplified fragments on ethidium bromide stained after run agarose gel electrophoresis which is costly. Pathology section of Regional Medical Science Center Ubon Ratchathani then developed this method by pooled sample before detection. It was found that the accuracy, precision and reproducibility of SEA, THAI and both of SEA and THAI type are one hundred percent in dilution 1:10. While the limit of detection of SEA type is equal or lower than 1:100 and THAI type is 1:40. So this development technique will reduce the cost and time to detect Alpha-thalassemia 1 by multiplex PCR.

Key words: **Alpha-thalassemia, SEA type, THAI type, pooled sample, multiplex PCR**