รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดโครงการ

การศึกษาเกี่ยวกับธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปรกติในภาคใต้ของประเทศไทย

Study of thalassemias and abnormal hemoglobins in the South of Thailand

ผู้รายงาน

ดร.จำนงค์ นพรัตน์

หน่วยธาลัสซีเมีย ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

เลขหมู่ RC643.T5 จ83 ฉบ1 ค. 1
Bib Key 222693

บทคัดย่อ

ชื่อชุดโครงการวิจัย การศึกษาเกี่ยวกับธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปรกติในภาคใต้ของประเทศไทย

Study of thalassemias and abnormal hemoglobins in the South of Thailand

ชื่อผู้รายงาน นายจำนงค์ นพรัตน์ คุณวุฒิ Ph.D. ตำแหน่งอาจารย์

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

โทรศัพท์ (074) 212070-9 ต่อ 1567 โทรสาร (074) 212908

ระยะเวลาทำการวิจัย ตั้งแต่ปี 2535 ถึง 2539

(ภาษาไทย)

เพื่อดำเนินการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในภาคใต้ของประเทศไทย คณะผู้วิจัยได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมมาใช้ตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย เทคนิคการตรวจกรองที่ได้ศึกษาในการวิจัยนี้คือ วิธีตรวจความเปราะของเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลองเดียว (one tube osmotic fragility test) พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจพาหะบีตาธาลัสซีเมีย แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และตรวจโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช โดยผลตรวจให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 และร้อยละ 88.4 ตามลำดับ ในกลุ่มพาหะของฮีโมโกลบินอีต้องใช้วิธีตกตะกอนด้วยสี DCIP (DCIP precipitation test) ร่วมด้วย เมื่อใช้ 2 วิธีนี้ร่วมกัน ทำให้สามารถตรวจธาลัสซีเมียที่สำคัญได้ทุกชนิด ขั้นตอนสำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะธาลัสซีเมียในทารกในครรภ์คือ การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ในการทดลองครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีที่ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี (non-radioactive method) โดยวิธีตรวจการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutations) ใช้ดิกออกซิจินิน (digoxigenin) ติดฉลากกับโพรบ (probe) แทน ^{32}P ซึ่งให้ความไวและความจำเพาะเช่นเดียวกับการใช้สารกัมมันตรังสี จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจในการตรวจประจำวัน (routine test) ส่วนธาลัสซีเมียที่เกิดจากจีนชนาดใหญ่ขาดหายเช่น บีตาธาลัสซีเมียชนิดจีนขาดหาย 3.5 กิโลเบส และแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากจีนขาดหายชนาด 17.5 กิโลเบส วิธีการตรวจทำได้โดยออกแบบไพรเมอร์ให้คร่อมรอยต่อตำแหน่งที่จีนขาดหายนั้น แล้วทำพีซีอาร์และอิเลคโตรโฟริซิส ที่เรียกว่าวิธี gap-PCR

การวางแผนควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียจำเป็นต้องทราบรูปแบบและชนิดการกลายพันธุ์ในกลุ่มประชากรนั้นๆก่อน เพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ โดยเฉพาะการกลายพันธุ์บีตาธาลัสซีเมียซึ่งมีความหลากหลายมาก จากการศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของจีนบีตาธาลัส (spectrum of β-thalassemia mutations) ในกลุ่มประชากรภาคใต้ พบว่าชนิดของการกลายพันธุ์และความถี่มีความแตกต่างจากการกลายพันธุ์ในภาคอื่นของประเทศ จีนบีตาธาลัสซีเมียที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้มี 15 ชนิด (รวมชนิดฮีโมโกลบินอี) และมี 7 ชนิดที่พบได้บ่อย คือ ชนิด 4 bp deletion ที่ codon 41/42 ชนิด IVS 1#5 (G-C) ชนิด codon 19 (AAC-AGC) ชนิด codon 17 (AAG-TAG) ชนิด IVS 1#1 (G-T) ชนิด -28 (A-G) และ ชนิด 3.5 kb deletion ซึ่งพบประมาณร้อยละ 91.5 และมี

3 ชนิดที่พบครั้งแรกในคนไทย คือ ชนิด Cap site (A-C) ชนิด IVS 1#1 (G-A) และชนิด 105 bp deletion การกลายพันธุ์ชนิด IVS 1#5 ชนิด codon 19 ชนิด IVS 1#1 และ ชนิด 3.5 kb deletion มีความถี่สูงกว่าภาคอื่นๆ ในจำนวนนี้ยังมีอีกร้อยละ 3.1 ที่ยังไม่ทราบชนิดการกลายพันธุ์

ได้นำวิธีการทดสอบดังกล่าวข้างต้น มาเปิดให้บริการแก่ผู้มารับบริการที่คลินิคฝากครรภ์ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยให้บริการตรวจกรองธาลัสซีเมียแก่สตรีที่มีอายุครรภ์ต่ำกว่า 16 สัปดาห์ ในช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคม 2537 ถึงเดือนตุลาคม 2538 ได้ตรวจกรองสตรีที่มาฝากครรภ์ทั้งหมด 1390 ราย ให้ผลบวก 378 ราย (ร้อยละ 27.2) และในจำนวน 378 ราย ให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐาน 334 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.4 ของผลตรวจกรอง หรือร้อยละ 24 ของสตรีตั้งครรภ์ทั้งหมดที่ได้ตรวจกรอง ซึ่งประกอบด้วย เป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมียร้อยละ 4 เป็นโรคบีตาธาลัสซีเมียร้อยละ 0.4 เป็นโรคบีตาธาลัสซีเมียกับฮีโมโกลบินอีร้อยละ 0.4 เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีร้อยละ 11.2 เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ร้อยละ 7.8 และเป็นโรคฮีโมโกลบินเฮ็ชร้อยละ 0.3 ในจำนวนภรรยา 334 ราย มีสามีมารับการตรวจ 247 ราย คิดเป็นร้อยละ 74 ของจำนวนภรรยาที่ผิดปรกติ และพบว่าสามีผิดปรกติ 71 ราย คิดเป็นร้อยละ 28.7 ของจำนวนสามีที่มาตรวจทั้งหมด และในจำนวนนี้ได้วิเคราะห์หาคู่เสี่ยง พบว่ามีทั้งหมด 27 คู่ คิดเป็นร้อยละ 1.9 ของสตรีที่ได้ตรวจกรองทั้งหมด การวิจัยครั้งนี้ได้ตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ทั้งหมด 31 ราย ซึ่งประกอบด้วย 27 รายได้จากแผนการป้องกันโรคดังกล่าวข้างต้น และ 4 รายจากครอบครัวที่เคยมีลูกเป็นโรคธาลัสสซีเมีย ผลการวินิจฉัยคือ ให้ผลปรกติ 6 ราย เป็นพาหะ 15 ราย เป็นโรค 8 ราย และปรกติหรือพาหะ 2 ราย

การพัฒนาวิธีตรวจทางอิมมูโนวิทยา ได้ใช้แอนติบอดีต่อโกลบิน 3 ชนิด คือ แอนติบอดีต่อโกลบินแอลฟา ต่อโกลบินเดลตา และต่อโกลบินบีตา มาทดสอบความจำเพาะและความไวในการทำปฏิกิริยา และได้นำมาประยุกต์หาระดับของโกลบินทั้ง 3 ชนิด ในเลือดผู้ป่วยโดยวิธี ELISA แล้วคำนวณสัดส่วนของค่า OD คือ ODanti-δ/ODanti-β (OD1/OD2) และ ODanti-α/ODanti-β (OD3/OD2) แล้วเปรียบเทียบค่าสัดส่วนดังกล่าวในตัวอย่างกลุ่มต่างๆ คือ กลุ่มคนปรกติ กลุ่มพาหะบีตาธาลัสซีเมีย กลุ่มโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช และกลุ่มพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย พบว่า OD1/OD2 มีความแตกต่างกันชัดเจน ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มคนปรกติและกลุ่มพาหะบีตาธาลัสซีเมีย และค่าสัดส่วนของ OD3/OD2 มีความแตกต่างกันชัดเจน ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปรกติและกลุ่มพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และกลุ่มโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช วิธีนี้จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมอีกวิธีหนึ่งในการตรวจหาพาหะของโรคในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ เพราะสามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก

(ภาษาอังกฤษ)

To establish a control program for thalassemia and abnormal hemoglobin in the south of Thailand, laboratory screening and diagnostic methods have been developed and evaluated at Songklanagarind Hospital. One tube osmotic fragility (1-tube OF) and dichlorophenol-indophenol precipitation (DCIP) tests were performed for thalassemia carrier screening The sensitivity and specificity were 100% and 88.4%, respectively. By using a combination

of these two tests, all of common types of thalassemia can be detected. Molecular diagnosis was carried out by direct detection of the relevant mutations after PCR amplification of the globin genes. The detection of point mutations was made using hybridization of specific oligoprobe to a PCR-amplified fragment on a nylon membrane. The oligoprobe used in the hybridization was labeled with digoxigenin (Dig). The mutation was then identified by color development of Dig and anti-Dig enzymatic system. For common deletions such as 3.5-kb deletion of β-thalassemia and 17.5-kb deletion of α-thalassemia were detected by PCR amplification of the fragment which includes the deletion region (gap-PCR). A combination of these molecular techniques with automated fluorescene-based DNA sequencing, we have performed a systematic servey of mutations causing thalassemias in these area to know the distributions and phenotype-genotype relationships in order to set up a prenatal diagnosis. We studied 282 β-thalassemia allels from 253 unrelated individuals. A total of 15 different β-thalassemia mutations including Hb E were detected and 7 mutations were found to be more common (91.5%) including 4 bp deletion at codons 41/42, IVS 1#5 (G-C), codon 19 (AAC-AGC), codon 17 (AAG-TAG), IVS 1#1 (G-T), position -28 (A-G) and 3.5 kb deletion. This study is the first report of 3 mutations in Thailand including the mutations at cap sit +1 (A-C), at IVS 1#1 (G-A) and 105 bp deletion at 5' end of the beta globin gene. After screening for 25 known mutations and sequencing of the 5' end fragment, the mutations remain unidentified in 9 alleles (3.1%). Studies to characterize these alleles in the remaining portions of the gene are currently being undertaken.

The control program by using the above procedures were performed on pregnant women who attended at antenatal clinic with pregnancy age of 16 weeks or less. They werecounseled and offered a thalassemia screening. From May 1994 to October 1995, 1390 pregnant women were screened and 378 (27.2%) gave positive result. Among these women, 334 (88.4%) were positive with standard method. The incidence of thalassemia in pregnant women was calculated to be 24% including β-thalassemia trait 4%, thalassemia major 0.4%, β-thalassemia with Hb E 0.4%, Hb E 11.2%, α-thalassemia 1 trait 7.8% and Hb H disease 0.3%. Approximately 74% of their husbands requested screening and 27 couples were found to be at risk for severe thalassemia, accounting for 1.9% of all pregnancies screened. The prenatal diagnosis was performed in 31 couples at risk, 27 from screening program and 4 from families of affected children. The diagnoses were as follows: 6 normal genotypes, 15 carrier genotypes, 8 affected genotypes and 2 normal or carrier genotypes.

Enzyme link immunosorbant assay (ELISA) was developed for detection of δ-, β-, and α-globin chains in peripheral blood of patients by usinng monocalonal antibody specific for these globin chains (Immuno-rx, USA) and adapted for thalassemia carrier screening .

The test were performed in 4 groups of hemolysate including normal Hb type, β-thalassemia trait, Hb E, Hb H and α-thalassemia trait. The ratio of ODanti-δ/ODanti-β (OD1/OD2) and ratio of ODanti-α/ODanti-β (OD3/OD2) of each group was calculated and compared. The OD1/OD2 was significantly different ($p < 0.001$) between normal Hb type and β-thalassemia trait. The OD3/OD2 was significantly different ($p < 0.001$) between normal Hb type and Hb H and α-thalassemia trait. The development of this technic will be useful for large scale screening of thalassemias.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	9
หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	9
วิธีดำเนินการวิจัย	11
1. วิธีมาตรฐานทางโลหิตวิทยาใช้ตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย	11
1.1 วิธีทำฮีโมโกลบินอิเลคโตรโฟริซิส	11
1.2 การหาปริมาณฮีโมโกลบินเอ 2 โดยวิธี cellulose acetate elution technique	13
1.3 การตรวจหาปริมาณฮีโมโกลบินเอฟโดยวิธี Alkaline Denaturation Method	14
2. วิธีตรวจกรองธาลัสซีเมีย	16
2.1 วิธีทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง	16
2.2 การทดสอบฮีโมโกลบินอี (Hb E) โดยการตกตะกอนด้วยสี DCIP	17
2.3 การย้อมอินคลูชั่นบอดี	18
3. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย	19
3.1 วิธีเก็บและเตรียมตัวอย่าง	19
3.2 วิธีเตรียมดีเอ็นเอ	20
3.3 การตรวจมิวเตชั่นของจีนบีต้าธาลัสซีเมียด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นของโอลิโกโพรบที่ติดฉลากด้วยดิกออกซิจินิน (digoxigenin)	23
3.4 วิธีตรวจหาลำดับเบสด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ	28
3.5 วิธีตรวจจีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA	35
3.6 วิธีตรวจจีนบีตาธาลัสซีเมียชนิดจีนแหว่ง 3485 เบส	37
4. การพัฒนาการตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา	39
ผลการวิจัย	43
1. ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาและผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ	43
2. ผลการตรวจโดยวิธีตรวจกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปรกติ	51
2.1 ผลการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง	51
2.2 ผลการตรวจกรองธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปรกติ ชนิดฮีโมโกลบินอี และฮีโมโกลบินเฮ็ช โดยวิธีตกตะกอนด้วยสี DCIP	52
2.3 ผลการตรวจหาอินคลูชั่นบอดีในเม็ดเลือดแดง เพื่อตรวจวินิจฉัย	53

หน้า

แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช
3. ความถี่และชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมีย 54
4. ผลการตรวจกรองคู่สามีภรรยาที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ 54
5. ผลการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ 57
6. ผลการพัฒนาวิธีตรวจทางอิมมูโนวิทยา 59
6.1 การเตรียมแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบิน 59
6.2 ผลการทดสอบแอนติบอดีสำเร็จที่มีผลิตทางการค้า 62
6.3 การพัฒนา ELISA เพื่อช่วยวินิจฉัยธาลัสซีเมีย 65
ข้อวิจารณ์ 71
สรุปและข้อเสนอแนะ 75
บรรณานุกรม 77
ผลงานวิจัยตีพิมพ์ 81

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ชนิดการกลายพันธุ์และความถี่ของจีนบีตาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง (ND = not determined, * ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้)	5
ตารางที่ 2	สรุปวิธีทางอณูวิทยาที่ใช้ตรวจจีนธาลัสซีเมียชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย	7
ตารางที่ 3	ค่าปรกติทางโลหิตวิทยา ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย	15
ตารางที่ 4	ลำดับเบสของโอลิโกโพรบและ washing temperature สำหรับใช้ตรวจมิวเตชั่นของบีต้าธาลัสซีเมียชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย	26
ตารางที่ 5	แสดงผลการตรวจทางโลหิตวิทยาและผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของตัวอย่างจำนวน 300 ราย ให้ผลตรวจปรกติ จำนวน 112 ราย และผิดปรกติ 188 ราย	43
ตารางที่ 6	แสดงค่า sensitvity (sens.) ค่า specificity (spec.) ค่า positive (+ pred.) และ negative (- pred.) predictive values ของการทดสอบ one tube osmotic fragility test ในกลุ่มตัวอย่าง 8 กลุ่มในตารางที่ 5	52
ตารางที่ 7	แสดงค่า sensitvity (sens.) ค่า specificity (spec.) ค่า positive (+ pred.) และ negative (- pred.) predictive values ของการทดสอบ DCIP test ในกลุ่มตัวอย่าง 8 กลุ่มในตารางที่ 5	53
ตารางที่ 8	แสดงผลการทดสอบการย้อมอินคลูชั่นบอดีในเม็ดเลือดแดง ของพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียและโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช ซึ่งมีความไวร้อยละ 75.6 และ 83.3 ตามลำดับ	53
ตารางที่ 9	ชนิดการกลายพันธุ์และความถี่ของจีนบีตาธาลัสซีเมีย จากพาหะและผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวนตัวอย่าง 282 อัลลีล	54
ตารางที่ 10	แสดงผลการตรวจกรอง (screening test) ในสตรีตั้งครรภ์ ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538 จากหญิงตั้งครรภ์ 1390 ราย ให้ผลบวก 378 ราย คิดเป็นร้อยละ 27.2 ของหญิงตั้งครรภ์ทั้งหมด	55
ตารางที่ 11	แสดงผลการตรวจโดยวิธีมาตรฐานทางโลหิตวิทยา เพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียในหญิงฝากครรภ์ ที่ให้ผลบวกกับวิธีตรวจกรองจากตารางที่ 10 ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538 จำนวน 378 ราย ให้ผลบวก 334 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.4	56

หน้า

	ของจำนวนรายที่ให้ผลบวกกับการตรวจกรองหรือให้ผลบวกร้อยละ 24.0 ของหญิงตั้งครรภ์ทั้งหมด	
ตารางที่ 12	แสดงจำนวนสามีและภรรยาที่ให้ผลบวกโดยวิธีตรวจมาตรฐาน และจำนวนคู่เสี่ยงต่อการมีลูกโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538	57
ตารางที่ 13	ผลการตรวจทารกในครรภ์ ในคู่สมรสที่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมีย จำนวน 31 คู่ ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538	58
ตารางที่ 14	แสดงค่า OD ของ ELISA ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี้ต่อฮีโมโกลบินพอร์ทแลนด์ โดยทดสอบกับฮีโมโกลบินชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแอนติเจน	59
ตารางที่ 15	แสดงค่า OD ของ ELISA ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี้ต่อฮีโมโกลบินบาร์ท โดยทดสอบกับฮีโมโกลบินชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแอนติเจน	60
ตารางที่ 16	แสดงค่า OD ของ ELISA ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี้ต่อฮีโมโกลบินเฮ็ช โดยทดสอบกับฮีโมโกลบินชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแอนติเจน	51
ตารางที่ 17	เปรียบเทียบค่า OD ของ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆทำปฏิกิริยากับ anti-beta globin	63
ตารางที่ 18	เปรียบเทียบค่า OD ของ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆทำปฏิกิริยากับ anti-alpha globin	63
ตารางที่ 19	เปรียบเทียบค่า OD ของ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆทำปฏิกิริยากับ anti-delta globin	64
ตารางที่ 20	เปรียบเทียบค่า OD ของ ELISA ของ anti-beta, anti-alpha และ anti-delta ทำปฏิกิริยากับ hemolysate ของตัวอย่าง 4 กลุ่ม และแสดงค่าสัดส่วนของ OD เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม	66

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆบนจีนแอลฟาโกลบิน (A) และบีตาโกลบิน (B) ที่พบในประเทศไทย X, Y และ Z แสดงตำแหน่ง homology blocks และเส้นทึบแสดงบริเวณจีนทขาดหายไป	3
รูปที่ 2	ภาพถ่ายแสดงรูปร่างของเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย	11
รูปที่ 3	ภาพถ่ายแสดงตำแหน่งของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆเมื่อวิ่งในกระแสไฟฟ้าจาก cellulose acetate electrophoresis pH 8.6	13
รูปที่ 4	แสดงขั้นตอนการทำไฮบริไดเซชั่นของโลโกโพรบที่ติดฉลากด้วยดิกออกซิจินิน	27
รูปที่ 5	ตัวอย่างการอ่านผลโอลิโกโพรบไฮบริไดเซชั่นจากดีเอ็นเอของผู้ป่วย 6 ราย เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิดโคดอน 19(AAC-AGC) ผลปรกติ 1 ราย โฮโมไซโกต 2 ราย และเฮทเตอร์โรไซโกต 3 ราย	28
รูปที่ 6	ขั้นตอนการหาลำดับเบสด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (fluorescence-based automated DNA sequencing)	30
รูปที่ 7	แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้หาลำดับเบสบริเวณเอ็กซอน 1 และเอ็กซอน 2 ของจีนบีตาโกลบิน	31
รูปที่ 8	ตัวอย่าง chromatogram ที่อ่านได้จากเครื่องอัตโนมัติโดยใช้โปรแกรม data analysis ของ ABI	34
รูปที่ 9	ตัวอย่าง chromatogram ที่มี mutation เกิดขึ้น ตรงลูกศรชี้มีเบส T เปลี่ยนเป็น G (Cap site mutation) ผู้ป่วยรายนี้เป็นพาหะ (heterozygote) ของ mutation ชนิดนี้	35
รูปที่ 10	ตัวอย่างการอ่านผลพีซีอาร์หลังจากทำอิเล็กโตรโฟริซิสบนแผ่นวุ้นเพื่อวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA (M = DNA marker; C = carrier; H = Hb Bart's hydrop fetalis; N = normal; F1, F2, P1, P2 = patients) และไดอะแกรมแสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์และตำแหน่งของจีนทขาดหายไปประมาณ 17.5 กิโลเบส A4, A1B และ A9 คือพีซีอาร์ไพรเมอร์ ถ้าเป็นจีนปรกติจะได้ผลพีซีอาร์ระหว่างไพรเมอร์ A4 กับ A1B ขนาด 194 เบส และถ้าเป็นจีน SEA จะได้ผลพีซีอาร์ระหว่างไพรเมอร์ A4 กับ A9 ขนาด 570 เบส	37

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

AF	amniotic fluid
ASO	allel-specific oligonucleotide
bp	base pairs
cod	codon
CVS	chorionic villus sample
DCIP test	dichlorophenolindophenol precipitation test
del	deletion
dig	digoxigenin
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme link immunosorbant assay
Hb	hemoglobin
HCT	hematocrit
Inclsn	inclusion
IVS	intervening sequence
kb	kilobase
MED	Mediteranean
ND	not determined
nt	nucleotide
NSS	normal saline solution
OD	Optical density
OF	osmotic fragility
PCR	Polymerase chain reaction
SEA	Southeast Asian
sens.	sensitvity
spec.	specificity
1-tube OF test	one tube osmotic fragility test
- pred.	negative predictive value
+ pred.	positive predictive value
- ve	negative
+ ve	positive

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นภาวะผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบบ่อยและเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศไทย[1-4] มีอุบัติการสูงในประเทศแถบเอเชียอาคเนย์ อินเดีย ทะเลจีนใต้ และเมดิเตอร์เรเนียน[5] ธาลัสซีเมียเกิดจากการสร้างสายโกลบินลดลงหรือไม่มีการสร้างเลย ทำให้ผู้ป่วยมีระดับของฮีโมโกลบินต่ำ มีอาการซีด เหลือง ตับม้ามโต เจริญเติบโตช้า กระดูกใบหน้าเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า "ใบหน้าธาลัสซีเมีย" ชนิดของโรคธาลัสซีเมียที่รุนแรงและพบบ่อยในประเทศไทยมี 3 ชนิดคือ โรคทารกบวมน้ำชนิดมีฮีโมโกลบินบาร์ทส์ (hemoglobin Bart's hydrop fetalis) เป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงที่สุด ผู้ป่วยจะเสียชีวิตก่อนคลอด หรือคลอดออกมามีชีวิตอยู่ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง ที่มีอาการรุนแรงเป็นอันดับสองคือ ธาลัสซีเมียเมเจอร์ หรือ homozygous thalassemia ผู้ป่วยมักตายตั้งแต่ยังเป็นเด็ก และที่มีอาการรุนแรงเป็นอันดับสามคือ โรคบีตาธาลัสซีเมียกับจีนของฮีโมโกลบินอี (β-thal / Hb E) อาการของผู้ป่วยมีความแตกต่างกันมาก ตั้งแต่มีอาการน้อยมากจนถึงมีอาการเท่ากับธาลัสซีเมียเมเจอร์

ธาลัสซีเมียที่สำคัญมี 2 กลุ่มคือ แอลฟาธาลัสซีเมีย (α-thalassemia) และบีตาธาลัสซีเมีย (β-thalassemia) ในประเทศไทย ประมาณร้อยละ 20-40 ของประชากรมีจีนแอลฟาธาลัสซีเมีย และร้อยละ 3-9 มีจีนบีตาธาลัสซีเมีย[2,3] นอกจากนี้ยังพบจีนของฮีโมโกลบินผิดปรกติอีก 2 ชนิดที่ทำให้เกิดธาลัสซีเมีย คือ ฮีโมโกลบินอี ซึ่งมีอุบัติการทั่วประเทศประมาณร้อยละ 13 และฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง ทั่วประเทศประมาณร้อยละ 1-11 พบว่าในประเทศไทยประมาณร้อยละ 1 ของประชากรเป็นโรคเลือดจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง[3,4] จากความแพร่หลายและความสำคัญของโรคธาลัสซีเมียนำไปสู่การศึกษารายละเอียดในแง่มุมต่างๆ รวมทั้งกลไกและปรากฏการณ์ทางกรรมพันธุ์[5-8] ได้มีการการพัฒนาและนำเทคโนโลยีสมัยใหม่มาประยุกต์ใช้ในการศึกษา ทำให้ทราบถึงความผิดปกติระดับอณูในลักษณะต่างๆ กัน[9-11] และพบว่าความผิดปกติระดับอณูที่ทำให้เกิดธาลัสซีเมียนั้นมีหลายชนิด และมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่และแต่ละกลุ่มประชากร โดยทั่วโลกมีรายงานแล้วเกือบ 200 ชนิด[12] สำหรับในประเทศไทยพบว่าอย่างน้อยมี 24 ชนิดที่ทำให้เกิดโรคบีตาธาลัสซีเมีย และอย่างน้อย 4 ชนิดที่ทำให้เกิดโรคแอลฟาธาลัสซีเมีย[3] ความถี่ของการกลายพันธุ์แต่ละชนิดในแต่ละภูมิภาคของประเทศจะไม่เท่ากัน เช่น ในภาคใต้พบว่า ในบีตาธาลัสซีเมีย มีการกลายพันธุ์ชนิด A-G ที่โคดอน 19 ชนิด G-C ที่ตำแหน่งนิวคลิโอไทด์ 5 ของ IVS1 และชนิดจีนบีตาโกลบินแหว่งหายไป 3.5 กิโลเบส พบได้บ่อยกว่าภาคอื่นของประเทศ[13-17] เป็นต้น

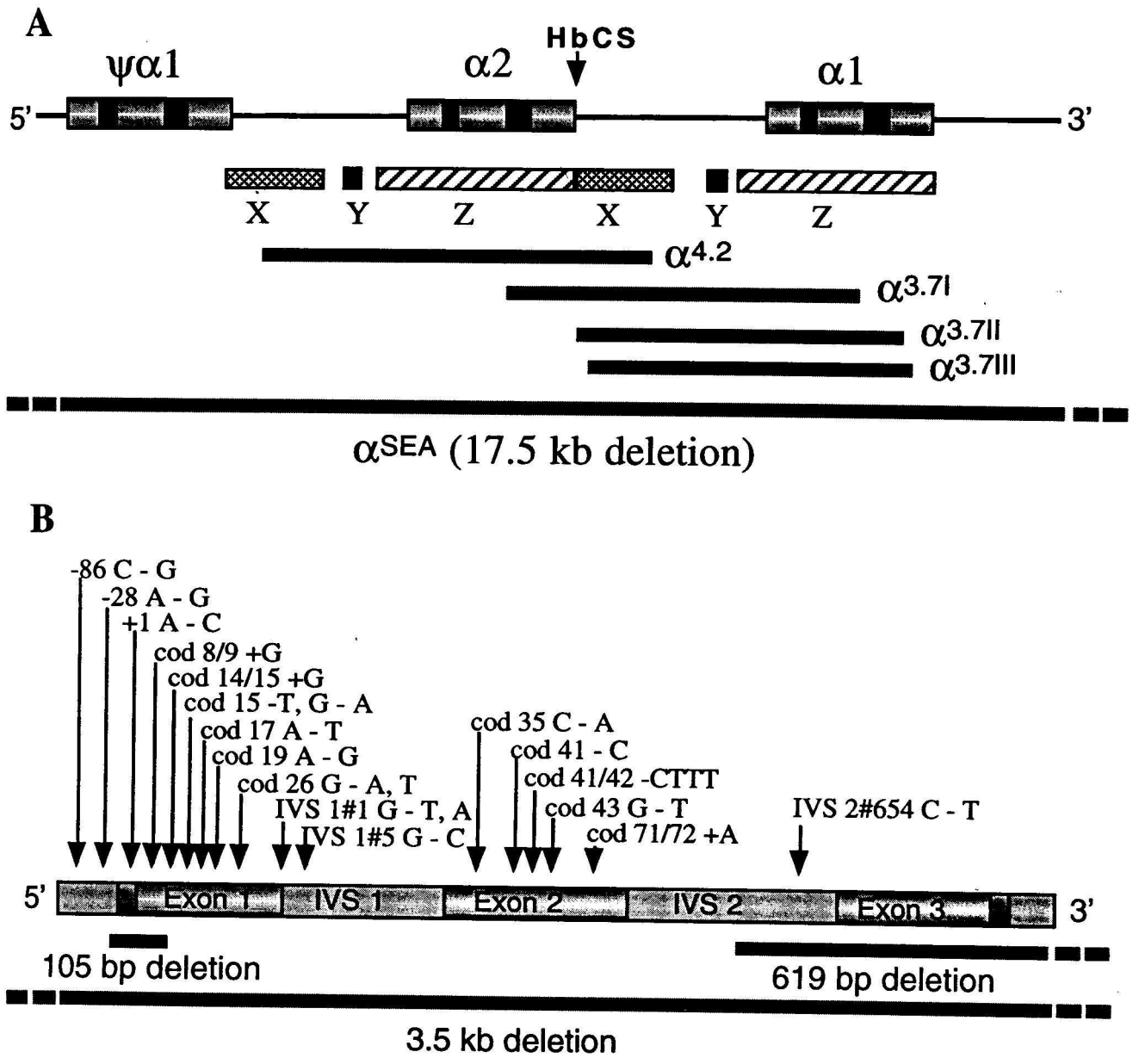
แอลฟาธาลัสซีเมีย ส่วนใหญ่เกิดจากจีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปเป็นท่อนยาวหลายกิโลเบส[6] (large deletion) ทำให้การสร้างสายแอลฟาโกลบินลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย ความรุนแรงที่เกิดจะขึ้นอยู่กับจำนวนจีนแอลฟาโกลบินที่ขาดหายไป แอลฟาธาลัสซีเมียแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α-thalassemia1) หรือแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมีย (α^o-thalassemia) แอลฟาธาลัสซีเมียชนิดนี้จะไม่มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินเลย ส่วนใหญ่เกิดจากจีนแอลฟาทั้ง 2 โลไซ (loci) ขาดหายไป แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ที่พบบ่อยในอาเซียอาคเนย์รวมทั้งในประเทศไทยคือชนิด SEA (Southeast Asia type) เกิดจากจีนขาดหายไป 17.5 กิโลเบส[7-9] โฮโมไซโกต (homozygote) ของจีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1

(--/--) จะไม่สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินได้เลย ทำให้เกิดโรคทารกบวมน้ำชนิดมีฮีโมโกลบินบาร์ท (Hb Bart's hydrops fetalis) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงที่สุดและทารกที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดนี้จะเสียชีวิตทั้งหมด[5] และอีกชนิดคือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α-thalassemia 2) หรือ แอลฟาบวกธาลัสซีเมีย (α^+-thalassemia) แอลฟาธาลัสซีเมียชนิดนี้สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินได้แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าปรกติ มีอาการรุนแรงน้อยกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ความผิดปรกติส่วนใหญ่เกิดจากท่อนดีเอ็นเอท่อนสั้นๆขาดหายไป เหลือจีนแอลฟาโกลบินเพียงจีนเดียวที่ทำหน้าที่ได้ ชนิดที่พบบ่อยคือชนิดจีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ($\alpha^{3.7}$) และ 4.2 กิโลเบส ($\alpha^{4.2}$) แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 นี้พบได้บ่อยกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 มาก แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 นอกจากจะเกิดจากจีนแหว่งแล้ว ยังมีอีกหลายชนิดที่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ชนิดที่พบบ่อยคือฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง[18,19] (Hb Constant Spring, Hb CS) เป็นฮีโมโกลบินผิดปรกติที่เกิดจากการแทนที่เบส (base substitution) 1 ตัว ที่โคดอนหยุด (stop codon) คือเบส U เปลี่ยนเป็น C ทำให้โคดอนหยุดเลื่อนถัดไปอีก 31 โคดอน และสร้างสายแอลฟาโกลบินที่ไม่เสถียร เฮเตอโรไซโกตเชิงซ้อน (compound heterozygote) ของแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (--/-α) ทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช (Hb H diseases) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงปานกลาง (thalassemia intermedia)

รูปที่ 1 (A) แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของจีนแอลฟาโกลบิน ที่พบในประเทศไทย

ส่วนบีตาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปรกติของจีนบีตาโกลบินที่ทำให้การสร้างสายบีตาโกลบินลดลงหรือไม่สร้างเลย ความผิดปรกติส่วนใหญ่เกิดจากการที่มีเบสเปลี่ยนแปลงไปเฉพาะจุด[12] หรือเบสจำนวนน้อยๆขาดหายไป (small deletion) หรือเกินมา (small insertion) ความรุนแรงของบีตาธาลัสซีเมียขึ้นอยู่กับชนิดของการกลายพันธุ์ว่าจะยังคงสร้างสายบีตาโกลบินได้หรือไม่ ถ้าไม่สามารถสร้างได้เลยจะมีอาการรุนแรงมากกว่าเรียกว่าบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย (β^0-thalassemia) และถ้าสามารถสร้างได้บ้างจะรุนแรงน้อยกว่าเรียกว่าบีตาบวกธาลัสซีเมีย (β^+-thalassemia) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างจีนบีตาศูนย์กับบีตาศูนย์ (β^0/β^0) บีตาศูนย์กับบีตาบวก (β^0/β^+) หรือบีตาบวกกับบีตาบวก (β^+/β^+) ทำให้เกิดโรคบีตาธาลัสซีเมียได้หลายชนิดและมีอาการรุนแรงได้มากน้อยแตกต่างกัน

ชนิดของการกลายพันธุ์ในบีตาธาลัสซีเมียมีความหลากหลายมาก จนถึงปัจจุบันมีรายงานแล้วทั่วโลกเกือบ 200 ชนิด[12] และมี 24 ชนิด[3] ที่มีรายงานในประเทศไทย ดังแสดงในตารางที่ 1 การกลายพันธุ์ในบีตาธาลัสซีเมียมีหลายชนิด เช่น การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดทรานสคริปชั่นผิดปรกติ (transcription mutation) ชนิดที่พบบ่อยมี 2 ชนิดคือชนิดเบส C เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่ง -86 (-86, C-G) และชนิดเบส A เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่ง -28 (-28, A-G) ส่วนการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง -101 (C-T) ทำให้เกิดบีตาธาลัสซีเมียแบบแฝงเงียบ (silent β-thalassemia) เม็ดเลือดแดงของผู้ที่เป็นพาหะของการกลายพันธุ์ชนิดนี้จะมีขนาดและรูปร่างปรกติ และปริมาณฮีโมโกลบินเอ 2 ปรกติ แต่มีอัตราการสร้างสายโกลบินลดลง โฮโมไซโกตจะมีอาการรุนแรงปานกลาง การกลายพันธุ์ที่ทำให้ mRNA ทำหน้าที่ไม่ได้ (nonfunctional mRNA) ทำให้เกิดโคดอนหยุดขึ้นก่อนกำหนดและมีผลให้ mRNA ถอดรหัสต่อไม่ได้ (nonsense) มีรายงานในประเทศไทย 3 ชนิดคือ การกลายพันธุ์ที่โคดอน 17 (A-T) โคดอน 35 (C-A) และโคดอน 26 (G-T) การกลายพันธุ์แบบฟรมชิฟท์ (frameshift mutation) เกิดจากการขาดหายหรือแทรกของเบสประมาณ 1-4 เบส มีรายงานในประเทศไทย 3 ชนิด คือ ชนิดการกลายพันธุ์ที่เกิดจากจีน



รูปที่ 1 *ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ชนิดต่าง ๆบนจีนแอลฟาโกลบิน (A) และบีตาโกลบิน (B) ที่พบในประเทศไทย*

X, Y และ Z แสดงตำแหน่ง homology blocks และเส้นทึบแสดงบริเวณจีนที่ขาดหายไป

ขาดหายไป 4 เบส ที่โคดอน 41-42 (-CTTT) เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย ชนิดที่มีเบส A 1 ตัว แทรกที่โคโคดอน 71-72 (+A) และชนิดเบส G 1 ตัวแทรกที่โคดอน 14-15 (+G) การกลายพันธุ์ที่ทำให้การตัดต่อ mRNA ผิดปรกติ (mRNA processing mutation) มีรายงานแล้วกว่า 30 ชนิด เช่น การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ 1 ของอินทรอน 1 (IVS-1 nt 1, G-T) การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ 5 ของอินทรอน 1 (IVS-1 nt 5, G-C) การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ 654 ของอินทรอน 2 (1IVS-2 nt 654, C-T) ฮีโมโกลบินอี (โคดอน 26, G-A) การกลายพันธุ์ที่โคดอน 24 (T-A) และฮีโมโกลบินมาเลย์ (โคดอน 19, A-G) เป็นต้น และการกลายพันธุ์ที่เกิดจากจีนขนาดใหญ่แหว่งหายไป[22-23] ทำให้เกิดบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย เช่น ชนิดจีนขาดหายไป 619 เบส ทางด้าน 3' ของจีนบีตาโกลบิน และชนิดจีนขาดหายไป 3485 เบส[20,21]

ตำแหน่งการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆของจีนบีตาโกลบินที่พบในประเทศไทย แสดงในรูปที่ 1 (B)

จะเห็นว่าลักษณะการกลายพันธุ์ (mutations) ที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียมีหลายชนิด และความถี่และชนิดของการกลายพันธุ์ที่พบในแต่ละภาคของประเทศจะแตกต่างกัน จากความหลากหลายและความแตกต่างกันเหล่านี้ ทำให้โรคธาลัสซีเมียมีได้หลายชนิดและมีอาการต่างๆกัน ก่อให้เกิดปัญหาและความยุ่งยากในการตรวจวินิจฉัยและการดูแลรักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมที่จะรักษาโรคธาลัสซีเมียให้หายขาดได้ ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ ทำให้โรคธาลัสซีเมียสามารถป้องกันได้ โดยการตรวจหาคู่สมรสที่มีโอกาสมีลูกเป็นโรคและการพิจารณาตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ เพื่อแนะนำให้ยุติการตั้งครรภ์หากพบว่าทารกในครรภ์เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงชนิดใดชนิดหนึ่งใน 3 ชนิดดังกล่าวข้างต้น ส่วนสำคัญในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียคือ การตรวจกรองและการตรวจวินิจฉัยพาหะได้อย่างทั่วถึง วิธีการตรวจกรองที่สามารถจะให้บริการได้ในระดับชุมชนมีหลายวิธี เช่น one tube osmotic fragility test (1-tube OF test) เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงที่ผิดปรกติ เช่น target cell, hypochromic red cell, polychromacia เป็นต้น เม็ดเลือดแดงเหล่านี้จะมีความทนต่อความเข้มข้นของเกลือ 0.36% ได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ[22] การทดสอบฮีโมโกลบินผิดปรกติชนิดฮีโมโกลบินอีโดยวิธี DCIP precipitation โดยวิธีนี้ฮีโมโกลบินอีจะตกตะกอนให้เห็นในสารละลาย DCIP[23] การย้อมอินคลูชั่นบอดีย์ (inclusion bodies staining) เป็นการทดสอบหาฮีโมโกลบินเอช (HbH) ฮีโมโกลบินชนิดนี้จะถูกออกซิไดซ์ด้วยสี methylene blue และตกตะกอนให้เห็นเป็นสีน้ำเงินคล้ายลูกปัดอยู่เต็มเซล การทดสอบหาอินคลูชั่นบอดีย์นี้ถ้าพัฒนาให้มีความไวสูงจะสามารถตรวจวินิจฉัย α-thalassemia 1 trait ได้[24] นอกจากนี้การตรวจกรองพาหะโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาก็สามารถทำได้ ให้ผลถูกต้องแม่นยำ และสามารถทดสอบจำนวนตัวอย่างคราวละมากๆได้ เช่น การตรวจหาปริมาณ HbA_2 HbBart's และ HbC ในพาหะบีตาธาลัสซีเมียโดยวิธี ELISA[25-27] การทดสอบหาฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นๆ โดยปฏิกิริยาของ monoclonal antibodies และ enzyme immunoassay[28-30] หรือการทดสอบหาปริมาณซีต้าโกลบินในพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด --SEA โดยวิธี slot blot immunobinding assay[30] วิธีการเหล่านี้จะมีประโยชน์มากในการศึกษาและตรวจหาพาหะในกลุ่มประชากรจำนวนมาก การพัฒนาวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกริยาสายโซ่ของเอ็นไซม์โพลีเมอเรส (PCR)[31] และ ดอท-บลอทไฮบริไดเซชันกับตัวตรวจจับจำเพาะ (allele specific oligonucleotide-probe, ASO-probe)[13] มาใช้ตรวจหาความผิดปกติบนสายจีนโกลบิน ทำให้สามารถตรวจสอบพาหะและทารกใน

ตารางที่ 1 *ชนิดการกลายพันธุ์และความถี่ของจีนบีตาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง[3, 17] (ND = not determined, * ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้)*

ชนิดการกลายพันธุ์	ความถี่ (ร้อยละ)							
	ไทย				มาเลเซีย	พม่า	อินเดีย	จีน
	ใต้*	กลาง	เหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ				
Codon 41/42 (TTCTTT->TT)	30.1	41.6	39.8	37.7	12.2	21.2	11.8	46.7
IVS 1#5 (G->C)	18.8	4.3	2.8	0	48.8	27.2	22.5	1.9
Codon 19 (AAC-AGC)	15.2	2.9	ND	0	14.6	0	0	0
Codon 17 (AAG->TAG)	11.3	16.5	39.8	29.5	2.4	7.1	0	17.6
IVS1#1 (G->T)	6.0	1.3	ND	1.6	7.3	34.3	13.7	0.5
-28 (A->G)	5.7	9.3	3.5	1.6	0	4.0	0	11.1
3.5 kb deletion	4.3	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IVS2#654 (C->T)	2.1	8.0	1.4	9.8	7.3	2.0	0	13.9
Codon 41 (-C)	1.4	0.8	ND	0	0	0	0	0
Codon 8/9 (AGTCT->AGGTCT)	0.4	0	0	0	0	0	19.6	0
105 bp deletion	0.4	0	0	0	0	0	0	0
codon 15 (TGG->TAG)	0.4	0	0	0	0	0	4.9	0
CAP site (A->C)	0.4	0	0	0	0	0	2.0	0
IVS1#1 (G->A)	0.4	0	0	0	0	0	0	0
-88 (C-T)	0	0	0	0	0	0	2.0	0
-86 (C-G)	0	0.5	0	0	0	0	0	0
Cod 16 (-C)	0	0	0	0	0	0	1.0	0
Cod 35 (C->A)	0	2.7	0	0	0	0	0	0
Cod 35 (-C)	0	0	0	0	4.8	0	0	0
Cod 71/72 (+A)	0	2.1	0	13.1	0	0	0	7.4
Cod 26 (G-T)	0	ND	0	1.6	0	0	0	0
619 bp deletion	0	1.1	0	0	0	0	20.5	0
Cod 43 (G-T)	0	0.8	0	0	0	0	0	0
Cod 15 (-T)	0	0.3	0	0	0	0	0	0
Cod 14/15(+G)	0	0.3	0	0	0	0	0	0
uncharacterized	3.1	5.1	13.3	4.9	2.4	4.1	2.0	0.5
จำนวนอัลลีลที่ศึกษา	282	375	113	61	41	99	102	216

ครรภ์ได้ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว มีคณะผู้วิจัยต่างๆได้พัฒนาขึ้นมาหลายวิธีด้วยกันเช่น การตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ตัวตรวจจับจำเพาะติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี[13] ทำให้สามารถตรวจสอบได้อย่างถูกต้อง และมีความไวสูง แต่มีข้อเสียคือค่าใช้จ่ายสูงและสารกัมมันตรังสีอาจเป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดสอบได้ จึงได้มีผู้พัฒนานำ สารเคมีชนิดอื่นมาใช้แทน เช่น biotin หรือ digoxigenin[32-35] โดยใช้ปฏิกริยาของ enzyme immunoassay นอกจากนี้การพัฒนาเอาเทคนิคของ gap-PCR มาใช้ตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เกิดจากการขาดหายไปของท่อนดีเอ็นเอขนาดใหญ่แทนการใช้วิธี Souhtern blotting เช่น การตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด SEA และ MED[36-38] และบีตาธาลัสซีเมียชนิด 3.5 Kb deletion[21] เป็นต้น ซึ่งให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และที่สำคัญคือไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี เพียงแต่ใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับ deletion นั้นๆ ทำให้ลดขั้นตอนการตรวจและลดต้นทุนลงได้ การตรวจหาลำดับของเบสของ DNA (DNA sequencing) เป็นวิธีตรวจสอบมิวเตชั่นของยีนที่เกิดจาก point mutation หรือ small deletion หรือ insertion ที่ยังไม่ทราบชนิด ซึ่งไม่สามารถตรวจได้จากเทคนิค ASO-probe hybridization วิธีที่นิยมใช้กันมากเรียกว่าวิธี dideoxy chain termination method ซึ่งค้นพบโดย Sanger และคณะ[39] ในระยะแรกเทคนิคนี้ต้องอาศัยการเตรียม recombinant DNA เพื่อสอดใส่ยีนที่ต้องการตรวจหาลำดับของเบสเข้าไปใน vector ซึ่งอาจเป็น plasmid, bacteriophage หรือ cosmid เมื่อเพิ่มจำนวนของ recombinant DNA ได้แล้ว จึงจะนำมาตรวจหาลำดับของเบสต่อไป แต่ในปัจจุบันการตรวจหาลำดับของเบสสามารถทำได้โดยตรง โดยเตรียม DNA ที่ต้องการตรวจสอบให้เป็น DNA สายเดี่ยว โดยปฏิกริยา PCR แล้วจึงนำมาตรวจหาลำดับของเบสด้วยเทคนิคของ Sanger ซึ่งต้องใช้ primer ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี แลปัจจุบันมีการพัฒนาใช้เครื่องมืออัตโนมัติ (automated DNA sequencer) และใช้ primers ที่ติดฉลากด้วยสาร fluorescence แทนสารกัมมันตรังสี[40]

ตารางที่ 2 *สรุปวิธีทางอณูวิทยาที่ใช้ตรวจจีนธาลัสซีเมียชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย*

ชนิดของจีนธาลัสซีเมีย	วิธีตรวจทางอณู	เอกสารอ้างอิง
α-thalassemia 1		
- SEA type	gap-PCR	8, 9, 37
- Thai type	Southern Blot Analysis	7, 11
α-thalassemia 2		
- 3.7 kb or 4.2 kb deletions	gap-PCR	41
- Hb CS	Allele Specific PCR	42
β-thalassemia		
Point mutations		
- Known mutations	PCR then ASO-probe hybridization	17, 35, 43, 44
- Unknown mutations	PCR then Sequencing	45, 46
Large deletion		
- Known breakpoint	gap-PCR	17, 21
- Unknown breakpoint	Southern Blot Analysis	20, 47

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิจัยค้นคว้าวิธีตรวจกรองพาหะของโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติ (screening test) ที่สามารถจะให้บริการได้ในระดับชุมชน และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจกรองพาหะโดยวิธีมาตรฐานในโรงพยาบาลระดับจังหวัด
2. เพื่อวิจัยค้นคว้าวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียในพาหะและทารกในครรภ์ระดับอณู (DNA diagnosis) ที่ถูกต้อง แม่นยำ ประหยัดค่าใช้จ่าย และไม่เสี่ยงอันตราย (ต่อผู้ตรวจสอบ) โดยพัฒนาวิธีที่ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี
3. เพื่อศึกษาหาความถี่ของชนิดการกลายพันธุ์ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ในภาคใต้ของประเทศไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

จากการวิจัยศึกษาเบื้องต้นพบว่า ความถี่ของลักษณะการกลายพันธุ์ชนิดธาลัสซีเมียในภาคใต้ของประเทศไทยแตกต่างจากภาคอื่น และมีอีกหลายชนิดที่ยังไม่ทราบชนิด เพราะฉะนั้นการพัฒนาวิธีที่เหมาะสม ประหยัดราคา สะดวกและรวดเร็ว จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการค้นหาพาหะและการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ผลการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางของการควบคุมและป้องกันโรคเลือดจางธาลัสซีเมียในระดับชุมชนและระดับประเทศที่ได้ผลและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะโครงการที่จะทดลองใช้ในจังหวัดพัทลุง ซึ่งมีพลเมืองประมาณ 5 แสนคน

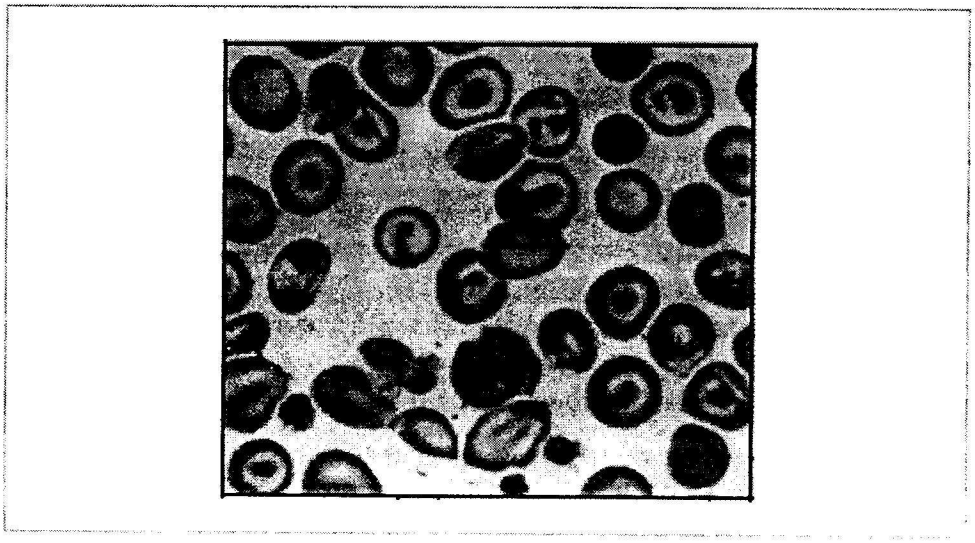
หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวินิจฉัยและควบคุมโรคธาลัสซีเมีย เช่น โรงพยาบาลระดับชุมชน โรงพยาบาลประจำจังหวัด กระทรวงสาธารณสุข ชมรมหรือมูลนิธิที่เป็นแหล่งข้อมูลแลกเปลี่ยนความรู้เรื่องธาลัสซีเมีย และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วิธีมาตรฐานทางโลหิตวิทยาที่ใช้ตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย[48-50]

การตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย จะใช้วิธีตรวจทางโลหิตวิทยา โดยตรวจเลือดผู้ป่วย เพื่อดูค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ย้อมดูลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงดังตัวอย่างภาพถ่ายในรูปที่ 2 วัดค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน แยกชนิดฮีโมโกลบินโดยทำอิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis) และตรวจวัดความเข้มข้นของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด การวัดค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงและความเข้มข้นของฮีโมโกลบินสามารถทำได้โดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่าเครื่องตรวจนับเม็ดเลือด (cell counter) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้เครื่อง H*1E ของบริษัท Technicon ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนการทำฮีโมโกลบินอิเลคโตรโฟริซิสและตรวจวัดความเข้มข้นของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด จะใช้วิธีดังต่อไปนี้



รูปที่ 2 *ภาพถ่ายแสดงรูปร่างของเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย*

1.1 วิธีทำฮีโมโกลบินอิเลคโตรโฟริซิส

<u>วิธีเตรียมน้ำฮีโมโกลบิน</u>

น้ำฮีโมโกลบิน (hemolysate) เตรียมขึ้นเพื่อนำไปใช้หาปริมาณและชนิดของฮีโมโกลบินในเลือด น้ำฮีโมโกลบินที่ดีจะต้องเตรียมโดยไม่มีสารโปรตีนชนิดอื่นปน โดยใช้ toluene หรือ carbon tetrachloride เป็นตัวสกัดแยกออกไป

<u>วิธีเตรียม</u> ใช้เลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง EDTA ใส่ในหลอดพลาสติค นำมาปั่น

ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นพลาสม่าทิ้ง ปั่นล้างด้วย 0.85% NaCl 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที ครั้งละ10 นาที ครั้งสุดท้ายถ่ายใส่หลอดแก้ว แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเม็ดเลือดแดง ผสมโดยเขย่าอย่างแรงเพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก แล้วเติม toluene ในปริมาตรครึ่งหนึ่งของน้ำฮีโมโกลบินที่ได้ เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex ประมาณ 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนที่เป็นชั้นของ toluene และเศษเซลทิ้ง กรองส่วนที่เป็นน้ำฮีโมโกลบินเก็บใส่หลอดพลาสติค ถ้ายังไม่ทำการทดสอบทันทีให้เก็บไว้ที่ -20°C

<u>วิธีแยกชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า</u>

เนื่องจากฮีโมโกลบินแต่ละชนิดประกอบด้วยชนิดและจำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ทำให้มีประจุไฟฟ้าต่างกัน และสามารถแยกออกจากกันได้โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิส บนแผ่น cellulose acetate ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่าง

<u>น้ำยาและวัสดุ</u>

1. Tris EDTA Borate buffer pH 8.5 และ 9.0 ประกอบด้วย

Trisma base	10.2	กรัม
EDTA.$_2H_2O$	0.764	กรัม
Boric acid	3.2	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล.แล้วปรับ pH ให้ได้ตามต้องการด้วย Trisma base หรือ boric acid

2. Ponceau S staining (0.5% W/V) ประกอบด้วย

Ponceau S	0.5	กรัม
Trichloroacetic acid	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล.

3. Destaining solution ประกอบด้วย

2.5 % citric acid เตรียมโดยเจือจางจาก 50% citric acid

4. แผ่นเซลลูโลสอะซิเตท และเครื่องทำอิเลคโตรโฟริซิส (Helena Laboratories, Beaumonnt, Texas)

<u>วิธีทำ</u>

1. แช่แผ่นเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate) ใน Tris EDTA Borate buffer pH 8.5 นานประมาณ 10 นาที ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศขณะจุ่มลงใน buffer โดยวางเอียงให้ buffer ค่อยๆซึมจนทั่วแผ่น ก่อนแช่ลงทั้งแผ่น

2. เจือจางน้ำฮีโมโกลบินในแต่ละตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกันด้วยน้ำกลั่น

3. ซับแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทด้วยกระดาษกรองให้พอหมาด แล้วหยดตัวอย่างน้ำฮีโมโกลบินจากข้อ 2 ให้ห่างจากปลายด้านหนึ่งประมาณ 2 ซม.โดยใช้ applicator

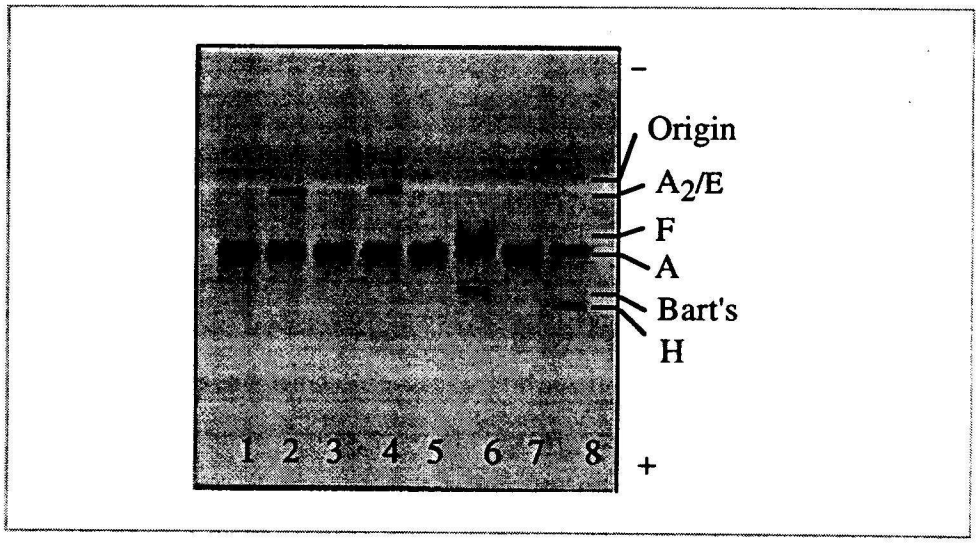
4. นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท ไปวางใน electrophoresis chamber โดยใช้กระดาษกรองเป็น

สะพานเชื่อมกับ buffer และใช้ Tris EDTA Borate buffer pH 9.0 เป็นตัวนำไฟฟ้า วางแผ่นเซลลูโลสอะซิเตทให้ปลายด้านที่หยดตัวอย่างอยู่ทางขั้วลบ

5. ทำอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 250 โวลท์ เป็นเวลาประมาณเวลา 15-20 นาที จนกว่าจะเห็นแถบของฮีโมโกลบินแยกกันชัดเจน

6. เมื่อครบเวลา ปิดกระแสไฟฟ้าแล้วนำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท ไปย้อมสีนาน 10 นาที จากนั้นนำไปล้างสีส่วนเกินออกด้วย 2.5% citric acid 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

7. อ่านแถบของฮีโมโกลบินเมื่อล้างสีส่วนเกินออกหมดแล้ว ดังตัวอย่างภาพถ่ายรูปที่ 3



รูปที่ 3 *ภาพถ่ายแสดงตำแหน่งของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆเมื่อวิ่งในกระแสไฟฟ้า จาก cellulose acetate electrophoresis pH 8.6*

1.2 การหาปริมาณฮีโมโกลบินเอ 2 โดยวิธี cellulose acetate elution technique

ปริมาณฮีโมโกลบินเอ 2 หรือฮีโมโกลบินชนิดอื่นสามารถตรวจวัดได้โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิศบน cellulose acetate strip แล้วตัดแถบฮีโมโกลบินแต่ละชนิดมาแช่ในน้ำกลั่น เพื่อชะล้างฮีโมโกลบินออกจาก cellulose strip แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm และคำนวนค่าร้อยละความเข้มข้นของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด

<u>น้ำยาและวัสดุ</u>

1. Tris EDTA borate buffer, pH 8.5 ประกอบด้วย

Tris base	10.2	กรัม
EDTA.$2H_2O$	0.7	กรัม
Boric acid	3.2	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล.และปรับ pH ให้ได้ 8.5 ด้วย tris หรือ boric acid

2. Cellulose acetate strip
3. Gelman Semi-Micro Electrophoresis chamber

วิธีทำ

1. แช่แผ่น cellulose acetate strip (Gelman) ขนาด 1 x 6 นิ้วลงใน buffer อย่างน้อย 10 นาที
2. นำแผ่น strip ออกมาซับให้หมาด แล้วใช้ applicator หยดน้ำละลายเลือดลงบนแผ่น strip
3. นำแผ่น strip ไปวางใน electrophoresis chamber ที่มี Tris EDTA borate buffer pH 8.5 เป็นตัวนำไฟฟ้า
4. ใช้กระแสไฟฟ้า 380 โวลท์ นาน 30 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบของฮีโมโกลบินแยกออกจากกันชัดเจน
5. ใช้กรรไกรตัดแยกแถบของฮีโมโกลบินใส่หลอดแก้ว แล้วเติมน้ำกลั่น 1.5 มล. สำหรับแถบ Hb A_2 และ 6 มล. สำหรับแถบ Hb A
6. ใช้พาราฟิล์มปิดหลอดแก้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร
7. คำนวนค่าร้อยละของฮีโมโกลบินเอ 2 โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเอ 2} = \frac{\text{OD ของ HbA2 x 100}}{\text{OD ของ HbA2 + (OD ของ HbA x 4)}}$$

การหาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินชนิดอื่นก็สามารถทำได้เช่นเดียวกับ Hb A_2

หมายเหตุ จากการทดลองเปรียบเทียบวิธี cellulose elution กับ วิธี microcolumn chromatography พบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

1.3 การตรวจหาปริมาณฮีโมโกลบินเอฟโดยวิธี Alkaline Danaturation Method

ฮีโมโกลบินแทบทุกชนิดจะถูกทำลายด้วยด่างและตกตะกอนด้วยสารละลาย acid ammonium sulfate ยกเว้นฮีโมโกลบินเอฟ (HbF) ที่สามารถทนต่อด่างได้ และจะเหลืออยู่ในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของด่าง และ acid ammonium sulfate ซึ่งสามารถวัดหาปริมาณได้

น้ำยาและวัสดุ

1. 1/12 N KOH เตรียมได้จาก KOH 5.5009 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มล.
2. 50% saturated acid ammonium sulfate โดยละลาย Ammonium sulfate 377.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มล.และ conc. HCl 2.5 มล.
3. Cyanide solution

   Solution A : ละลาย KCN 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

   Solution B : ละลาย $K_3Fe(CN)_6$ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

ก่อนใช้ผสม solution A และ solution B ในอัตราส่วนที่เท่ากัน

วิธีทำ

1. ดูด 1/12 N KOH 1.6 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13 x 100
2. ใส่น้ำเลือด (hemolysate) 0.1 มล. ลงในหลอดที่มี 1/12 N KOH อยู่เริ่มต้นจับเวลาทันที เขย่าหลอดทดลองให้เลือดเข้ากับน้ำยา
3. เมื่อครบเวลา 1 นาที เติม 50% saturated acid ammonium sulfate 3.4 มล. ลงในหลอดทดลองทันที ปิดพาราฟิล์มแล้วผสมให้เข้ากัน
4. กรองส่วนผสมผ่านกระดาษกรอง จะได้ "filtrate" ใส สีแดง
5. ทำ "total hemoglobin" โดยใส่น้ำละลายฮีโมโกลบิน 0.02 มล. ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น 5 มล. ผสมให้เข้ากัน
6. เตรียม blank สำหรับ "filtrate" โดยใช้ 1/12 N KOH 1.6 มล. และ 50% saturated acid ammonium sulfate 3.4 มล.
7. เตรียม blank สำหรับ "total" โดยใช้น้ำกลั่น 5 มล.
8. หยดส่วนผสมของ cyanide solution 2 หยดลงในหลอดทุกหลอด เพื่อเปลี่ยนฮีโมโกลบินทุกชนิดให้เป็น cyanmethemoglobin
9. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวนปริมาณของฮีโมโกลบินเอฟดังนี้

$$\text{ความเข้มข้น HbF} = \frac{\text{OD "filtrate"}}{\text{OD "total" x 20}} \%$$

หมายเหตุ นอกจากฮีโมโกลบินเอฟที่ทนต่อภาวะด่างได้แล้วฮีโมโกลบินอื่นๆเช่น ฮีโมโกลบินบาร์ท (Hb bart's) บางส่วนก็สามารถทนต่อภาวะด่างได้เช่นกัน ในน้ำละลายฮีโมโกลบินที่มีส่วนผสมของฮีโมโกลบินบาร์ทอยู่ จะทำให้ค่าร้อยละของฮีโมโกลบินเอฟที่หาโดยวิธีนี้สูงกว่าความเป็นจริงได้

ตารางที่ 3 *ค่าปรกติทางโลหิตวิทยา ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย*

การทดสอบ (หน่วยมาตรฐาน)	Hb conc (gm/dl)	HCT (%)	RBC count (x1012/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (gm/dl)
ชาย (range)	13.0-18.0	40-54	4.5-6.3	83-97	27-33	31-35
หญิง (range)	12.0-16.0	37-47	4.2-5.5	83-97	27-33	31-35
ทารกแรกเกิด (range)	14.0-23.0	43-63	4.1-6.1	99-113	35-41	34-38
อายุต่ำกว่า 4 ปี (mean)	12.6	37	4.6	80	27	34

2. วิธีตรวจกรองธาลัสซีเมีย[48-50]

2.1 วิธีทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง

วิธีทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงที่ทำได้สะดวกและทราบผลเร็วคือ วิธี One tube osmotic fragility หลักการของวิธีนี้คือเม็ดเลือดแดงปรกติเมื่ออยู่ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.36% จะแตกหมด แต่เม็ดเลือดแดงที่ผิดปรกติบางชนิดเช่น เม็ดเลือดแดงที่เป็น target cell หรือ hypochromic cell หรือ polychromasia จะแตกไม่หมด ทำให้ได้สารละลายมีลักษณะขุ่น สามารถแยกความผิดปรกตินี้ได้โดยดูด้วยตาเปล่า หรือคำนวณเป็นค่าร้อยละของการแตกของเม็ดเลือดแดง (% hemolysis) เทียบกับเม็ดเลือดคนปรกติ ที่เรียกว่าค่า OF โดยวัดคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

น้ำยาและวัสดุ

1. Stock buffer saline solution (10% NaCl buffer)

NaCl	90	กรัม
Na_2HPO_4	13.65	กรัม
$NaH_2PO_4.2H_2O$	2.43	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	มล.

2. 1% buffer saline solution

Stock solution	50	มล.
น้ำกลั่น	450	มล.

3. 0.36% NaCl buffer solution

1% buffer saline solution	180	มล.
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	500	มล.

วิธีการ

1. ดูด 0.36% NaCl buffer solution 5 มล.ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13x100 เขียนเป็นหลอด A
2. ดูดน้ำกลั่น 5 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาดเดียวกัน เขียนเป็นหลอด B
3. ดูดเลือด 0.02 มล. ใส่ในหลอดทดลอง A และ B ผสมเลือดให้เข้ากับน้ำยาโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
4. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสไปอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
5. คำนวนค่า %hemolysis ได้ดังนี้

$$\text{ค่า \%hemolysis} = \frac{\text{ค่า OD ของหลอด A}}{\text{ค่า OD ของหลอด B}} \times 100$$

ในคนปกติจะได้ค่า %hemolysis จะมากกว่า หรือเท่ากับ 85% ในพาหะ หรือโรคธาลัสซีเมียจะมีค่าต่ำกว่า 85% ในภาวะ hereditary ovalocytosis ค่า %hemolysis ต่ำกว่า 85% เช่นกัน

2.2 การทดสอบฮีโมโกลบินอี (Hb E) โดยการตกตะกอนด้วยสี DCIP

ฮีโมโกลบินอี เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่สายเบต้าโกลบินตำแหน่งโคดอนที่ 26 โดยมีกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก glutamic acid เป็น lysine ทำให้พันธะยึดเหนี่ยวระหว่างสายแอลฟ่ากับเบต้าลดลง ฮีโมโกลบินชนิดนี้จะอยู่ในรูป monomer เมื่ออยู่ในสารละลาย DCIP (Dichlorophenol Indophenol) ทำให้เกิด free-SH group ซึ่งจะถูก oxidised โดยสีทำให้เกิดตะกอน

น้ำยาและวัสดุ

1. DCIP reagent

Trisma base	4.36	กรัม
EDTA $Na_2.2H_2O$	2.68	กรัม
DCIP (Sigma)	0.0276	กรัม
Saponin	0.05	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 6N HCl และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มล.

วิธีการ

1. ปั่นเลือดที่เก็บโดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
2. ดูดส่วนเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลอด 0.02 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13x100 ที่มีน้ำยา DCIP 5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
3. เมื่อครบเวลา นำไปอุ่นต่อที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
4. อ่านผลโดยดูตะกอนที่เกิดขึ้นในหลอด ระวังอย่าเขย่าหลอดก่อนการอ่านผล เพราะจะทำให้ตะกอนละลายและอ่านผลผิดพลาด

การรายงานผล

0	=	สารละลายใส สีฟ้าอมเขียว ไม่มีตะกอน
1+	=	สารละลายขุ่น สีฟ้าอมเขียว ไม่มีตะกอน
2+	=	สารละลายขุ่น สีฟ้าอมเขียว พบตะกอนกระจายอยู่ทั่วไป
3+	=	สารละลายขุ่น สีฟ้าอมเขียว พบตะกอนบางส่วนตกอยู่ก้นหลอด
4+	=	สารละลายขุ่น สีฟ้าอมเขียว พบตะกอนทั้งหมดอยู่ที่ก้นหลอด

ข้อสังเกต

1. ให้ผลบวกในรายที่มีฮีโมโกลบิน E โดยมีระดับต่างกันคือ AE (E = 35-30%) = 1+, 2+; FE (E = 40-60%) = 1+, 2+; EE (E = 80-100%) = 3+, 4+
2. ให้ผลบวกในรายที่เป็น Hb H disease แต่ต้องมีปริมาณของ Hb H มากกว่า 2% ขึ้นไป จึงจะเห็นตะกอน
3. ระวังอย่าเขย่าหลอดทดลองก่อนอ่านผล เพราะจะทำให้ตะกอนบางส่วนละลายไปทำให้เกิด false negative
4. น้ำยาที่เตรียมจะมีอายุประมาณ 1 เดือน ถ้า pH ของน้ำยาเปลี่ยนแปลงจะทำให้เกิดผล false negative ได้

ข้อควรระวังในการทำการทดสอบกรองทั้ง 2 วิธี คือ

1. ความเป็นกรดด่างและความเข้มข้นของน้ำยาต้องถูกต้องแม่นยำ ไม่ควรใช้น้ำยาที่เก็บไว้นานเกิน 1 เดือน และน้ำยาสำรอง (stock solution) ควรเก็บไว้ที่ 4°C

2. การดูดเลือด ปริมาตรที่ใช้ต้องแม่นยำ ต้องเช็ดปลายไปเป็ตทิปทุกครั้ง โดยเฉพาะวิธีตรวจความเปราะของเม็ดเลือดแดง ปริมาตรของเลือดที่ใส่ในน้ำกลั่น และใน 0.36% NaCl ต้องมีปริมาตรเท่ากัน ไปเป็ตทิปที่ล้างใช้ซ้ำควรตรวจดูการปนเปื้อนหรือรอยหักงอทุกครั้ง เพราะจะทำให้ปริมาตรคลาดเคลื่อนได้

3. เลือดที่เก็บไว้นาน หรือเก็บในน้ำยากันเลือดแข็งที่ไม่เหมาะสม อาจให้ค่าตรวจสอบคลาดเคลื่อนได้

2.3 การย้อมอินคลูชั่นบอดี

ฮีโมโกลบินเฮ็ช (HbH) เป็นฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร เมื่อถูกออกซิไดซ์ด้วยสีในกลุ่ม supravital stain เช่น methylene blue จะตกตะกอนเห็นเป็นเม็ดสีน้ำเงินคล้ายลูกปัด (Inclusion bodies) อยู่เต็มเซล ซึ่งจะตรวจพบได้ในเม็ดเลือดแดงของพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช

น้ำยาและวัสดุ

1% methylene blue ประกอบด้วย

Methylene blue, powder	1	กรัม
0.9% NaCl	100	มล.

ละลายให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะใช้งานให้กรองอีกครั้งหนึ่ง

วิธีทำ

1. ผสมเลือด 1 หยด กับสี 1% methylene blue 2 หยด ในหลอดทดลองขนาด 10x75 เขย่าเบาๆให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม
2. นำไปอุ่นที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลานำมาหยดลงบนสไลด์ 1 หยด ปิดด้วย cover slip และทาขอบ cover slip ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อป้องกันการระเหย
4. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

หมายเหตุ

1. ผู้ป่วยโรค hemoglobin H disease (--/-α หรือ --/$\alpha^{cs}\alpha$) จะพบเม็ด inclusion bodies มากเกือบ 100%
2. ใน α-thalassemia1 trait พบ inclusion bodies ได้ 1 ใน 10,000 เม็ดเลือดแดง ในภาวะเช่นนี้สามารถเพิ่มความไวของการตรวจได้ โดยการนำเลือดไปปั่นแล้วดูดชั้นเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนใต้ชั้น buffy coat มาทำการย้อมโดยอุ่นที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาตรวจหาด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอมีส่วนสำคัญในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ทำให้สามารถตรรวจวินิจฉัยได้ตั้งแต่อายุครรภ์น้อยๆ คืออายุครรภ์ประมาณ 10-20 อาทิตย์ นอกจากนี้การตรวจดีเอ็นเอมีความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยในพ่อแม่ด้วย ทั้งนี้เพราะการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ให้ได้ผลถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว จะต้องตรวจและทราบการกลายพันธุ์ธาลัสซีเมียในพ่อและแม่ก่อนเสมอ

วิธีตรวจดีเอ็นเอมีหลายวิธี และแต่ละวิธีมีความเหมาะสมกับการตรวจการกลายพันธุ์แต่ละชนิด โดยทั่วไปการตรวจการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) จะใช้วิธี ASO-probe (allele specific oligonucleotide- probes) hybridization ในการวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธี ASO-probe hybridization ที่ใช้ digoxigenin ซึ่งเป็นสาร hepten ติดฉลากกับโพรบแทนสารกัมมันตรังสี (^{32}P) ส่วนจีนธาลัสซีเมียที่เกิดจากการกลายพันธุ์ชนิดจีนขนาดใหญ่แหว่งหายไป (large deletion) เช่น ในแอลฟาธาลัสซีเมีย ส่วนใหญ่จะใช้วิธี Southern blot hybridization ซึ่งมีวิธีทำและขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้นทุนในการตรวจสูง ไม่เหมาะกับการให้บริการตรวจผู้ป่วย ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธี gap-PCR มาใช้แทน หลักการของวิธี gap-PCR คือการทำพีซีอาร์ให้คร่อมรอยต่อของตำแหน่งที่จีนแหว่ง แล้วอ่านผลจากการทำ agarose gel electrophoresis

3.1 วิธีเก็บและเตรียมตัวอย่าง

<u>การเก็บตัวอย่างเลือด</u> (whole blood)

ตัวอย่างที่ใช้ตรวจคือเลือดจากเส้นเลือดดำประมาณ 5-10 มล โดยเจาะใส่ขวดปลอดเชื้อที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง นำเลือดมาปั่นประมาณ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) หลังจากนั้นปั่นล้างชั้นเม็ดเลือดขาวด้วยน้ำเกลือ (physiological saline) หรือ Phosphate buffer saline (0.01 M phosphate buffer pH 7.4 and 0.15 M NaCl) 3 ครั้ง แล้วเก็บที่ -20°C

<u>หมายเหตุ</u> ถ้าไม่สามารถนำไปเตรียมดีเอ็นเอได้ทันที ให้แช่ขวดเลือดในกระติกน้ำแข็งหรือตู้เย็น 4°C

<u>การเก็บตัวอย่างจากทารกในครรภ์</u> (Fetal samples)

1. <u>ชิ้นเนื้อรก</u> (chorionic villus sample, CVS) เก็บใส่น้ำยารักษาสภาพมีชีวิตของเซลล์ อาจเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือน้ำเกลือ (NSS) เก็บให้ได้อย่างน้อย 5 มิลลิกรัม คือประมาณ 5-10 กิ่ง อายุครรภ์ที่เก็บประมาณ 8-12 สัปดาห์ การเจาะเก็บครั้งหนึ่งๆ สามารถเก็บได้ 5-50 มิลลิกรัม เก็บใส่ขวดสะอาดไร้เชื้อ มีฝาเกลียวปิดมิดชิด ส่งถึงห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่อุณหภูมิห้อง ถ้าส่งจากทางไกลให้แช่น้ำแข็ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการนำมาใส่ petri dish แล้วล้างด้วยน้ำเกลือภายใต้กล้อง inverted microscope จนสะอาด ไม่มีเลือดปน ก่อนนำไปเตรียมดีเอ็นเอ หรือเก็บที่ -20°C

2. <u>เซลล์จากน้ำคร่ำ</u> (amniotic fluid cells, AF cells) ปริมาณที่ใช้ 10-20 มล สามารถเจาะเก็บได้ ในช่วงอายุครรภ์ 14-18 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงที่ครรภ์มีน้ำคร่ำและเซลล์มากพอ เก็บใส่

Central Library
Prince of Songkla University

หลอดสะอาดไร้เชื้อ ปิดฝาเกลียวให้มิดชิด โดยไม่ต้องใส่สารรักษาสภาพ ส่งถึงห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่อุณหภูมิห้อง หรือถ้าส่งจากทางไกลให้แช่น้ำแข็ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการ นำมาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ หรือ Phosphate buffer 3 ครั้ง โดยปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที ก่อนนำไปเตรียมดีเอ็นเอ หรือเก็บที่ -20°C

3. <u>เลือดจากสายสะดือทารก</u> (fetal blood) เก็บเหมือนกับการเก็บเลือดที่เจาะจากต้นแขน

3.2 วิธีเตรียมดีเอ็นเอ

วิธีการเตรียมดีเอ็นเอมีหลายวิธีและแต่ละวิธีจะเหมาะสมสำหรับตัวอย่างแต่ละชนิด

เตรียมจากเลือด (whole blood) ใช้วิธีเตรียม 3 วิธี คือ วิธี Salting out เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดที่มีปริมาณมาก ใช้เลือดประมาณ 10 มล. วิธี phenol chloroform เป็นวิธีเตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง และวิธีที่ใช้เตรียมดีเอ็นเอจากเลือดที่มีปริมาณน้อย คือใช้เลือดประมาณ 100 µl

1. <u>วิธี Salting out</u>

<u>น้ำยา</u>

lysis buffer (155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$ และ 0.1 mM Na_2EDTA, pH 7.4)
0.15 M KCl
SE buffer (75 mM NaCl, 25 mM Na_2EDTA, pH 8.8)
proteinase K (10 mg/ml)
20% SDS
6 M NaCl
absolute ethanol แช่ที่ -20°C
70% ethanol แช่ที่ -20°C
TE (10 mM Tris HCl pH 8.0 และ 1 mM EDTA)

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ใช้เลือดประมาณ 10 มล. ผสมกับ lysis buffer 30 มล แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
2. ปั่นล้างด้วย lysis buffer 2 ครั้งๆละ 15 นาที ที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C
3. นำตะกอนมาละลายใน 0.15 M KCl 150 มล ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหมือนข้อ 2 เพื่อเก็บตะกอน
4. เติม SE buffer 5 มล proteinase 25 µl และ 20% SDS 250 µl ผสมให้

เข้ากัน แล้ว incubated ที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชม

5. เติม 6 M NaCl 1.4 มล ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6. เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม absolute ethanol ในปริมาตร 2 เท่าและปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

7. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 2-3 ครั้ง

8. ทำตะกอนให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายใน 500-1000 µl TE buffer ก่อนนำไปวัดความเข้มข้น โดยวัด OD ที่ 260 nm

2. <u>เตรียมด้วยวิธี phenol chloroform</u>

<u>น้ำยา</u>

lysis buffer (155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$ และ 0.1 mM Na_2EDTA, pH 7.4)

0.15 M KCl

SE buffer (75 mM NaCl, 25 mM Na_2EDTA, pH 8.8)

proteinase K (10 mg/ml)

20% SDS

4 M NaCl

Phenol (saturated ด้วย 1 M Tris pH 8.0) และ Chloroform

absolute ethanol แช่ที่ -20°C

70% ethanol แช่ที่ -20°C

TE

<u>วิธีเตรียม</u>

1. หลังจาก incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชม จากวิธี salting out ให้นำมาเติม phenol และ chloroform ในปริมาตรครึ่งหนึ่ง ผสมเบาๆโดยกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที ดูดส่วนใสใส่ tube ใหม่ แล้วทำซ้ำ อีก 1 ครั้ง

2. เติม 4 M NaCl ในปริมาตร 1/10 และ absolute ethanol ในปริมาตร 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่ -20°C เป็นเวลา 15 นาที

3. ปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C แล้วเทส่วนใสทิ้ง

4. ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 2-3 ครั้ง

8. ทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายใน TE buffer 500-1000 µl ก่อนนำไปวัดความเข้มข้น โดยวัด OD ที่ 260 nm

<u>หมายเหตุ</u> วิธี phenol chloroform เป็นวิธีเตรียมที่เหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณมากและถ้าต้องการดีเอ็นที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น ใช้ทำ Souhtern Blot ควรเตรียมด้วยวิธี phenol/

chloroform ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ด้วยการหาค่าสัดส่วนของค่า OD ที่ 260 nm ต่อ 280 nm ซึ่งไม่ควรจะต่ำกว่า 1.7

3. <u>วิธีเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดที่มีปริมาณน้อยเพื่อใช้ทำพีซีอาร์</u>

วิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณน้อย เพื่อเตรียมดีเอ็นเอไปใช้ทำพีซีอาร์ ที่สำคัญคือเลือดที่ใช้เตรียมควรเป็นเลือดที่เก็บใหม่ๆ ไม่ควรใช้เลือดที่เก็บแช่แข็ง

<u>น้ำยา</u>

TE buffer

10 mg/ml proteinase K

10xPCR buffer

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ใช้เลือด 100 µl หรือชั้นเม็ดเลือดขาว 50 µl ผสมกับ TE buffer 1 มล ใน microtube แล้วปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อตกตะกอน เม็ดเลือดขาวและล้างน้ำเลือด (hemolysate) ทิ้ง
2. ละลายตะกอนในน้ำกลั่น 89 µl 10xPCR buffer 10 µl และ 10 mg/ml proteinase K 1 µl แล้ว incubate ที่ 65°C เป็นเวลา 1 ชม
3. นำมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที เพื่อทำลาย proteinase K
4. ใช้ 2.5 µl สำหรับทำพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 25 µl เพื่อตรวจ α-thalassemia และ 2 µl ในปริมาตรรวม 50 µl เพื่อตรวจ β-thalassemia

เตรียมจาก CVS หรือ AF cells

<u>น้ำยา</u>

PBS (0.01 M phosphate buffer pH 7.4 และ 0.15 M NaCl)

Buffer A (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl and 0.6% SDS)

proteinase K (10 mg/ml)

phenol ที่ saturated ด้วย 1 M Tris pH 8.0

chloroform: isoamyl alcohol (24:1)

3 M sodium acetate (NaOAc)

absolute ethanol แช่ที่ -20°C

70% ethanol แช่ที่ -20°C

TE buffer

วิธีเตรียม

1. นำตัวอย่างที่ล้างด้วย PBS หรือ น้ำเกลือ มาใส่ใน microtube แล้วนำไปปั่นด้วย ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2. เติม buffer A 500 µl และ proteinase K 50 µl ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubated ที่ 50°C เป็นเวลา 1-2 ชม หรือที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชม

3. เติม phenol 550 µl ผสมเบาๆเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่ tube ใหม่

4. เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่

5. ผสมกับ absolute ethanol ในปริมาตร 2 เท่า และ 3 M NaOAc ในปริมาตร 1/10 เท่า แล้วแช่ที่ -20°C เป็นเวลา 1 ชม

6. ปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างตะกอน 2-3 ครั้งด้วย 70% ethanol

7. ทิ้งให้แห้ง ก่อนละลาย ใน TE buffer หรือน้ำกลั่น 20 µl และ ใช้ 2 µl สำหรับพีซีอาร์ที่มีปริมาตรรวม 50 µl

3.3 การตรวจมิวเตชั่นของจีนบีต้าธาลัสซีเมียด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นของโอลิโกโพรบที่ติดฉลากด้วยดิกออกซิจินิน (digoxigenin)

มิวเตชั่นของจีนบีต้าธาลัสซีเมียที่ทราบชนิดแล้ว (known mutations) ส่วนใหญ่เป็น point mutaions ดังนั้นวิธีตรวจจึงนิยมใช้วิธีโอลิโกโพรบไฮบริไดเซชั่นของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากพีซีอาร์ ซึ่งสามารถทำได้ง่าย สะดวก และทราบผลเร็ว ในการวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีใช้ดิกออกซิจินิน ติดฉลากกับโอลิโกโพรบแทนสารกัมมันตรังสี และตรวจสอบผลไฮบริไดเซชั่นด้วยแอนติบอดีต่อดิกออกซิจินิน (anti-Dig) ที่ conjugated ด้วยเอ็นซัยม์ alkaline phosphatase ไดอะแกรมในรูปที่ 4 แสดงขั้นตอนวิธีตรวจสอบ โดยใช้โอลิโกโพรบที่จำเพาะสำหรับมิวเตชั่นที่พบบ่อยในประเทศไทยประมาณ 20 ชนิด (ตารางที่ 4) ในแต่ละชนิดจะมีโพรบ 2 ตัว คือตัวที่จำเพาะต่ออัลลีลปรกติ (normal probe) และที่จำเพาะต่ออัลลีลผิดปรกติ (mutant probe)

3.3.1 วิธีทำพีซีอาร์จีนบีตาโกลบิน

น้ำยา

PCR primers : S1: 5' TGT CAT CAC TTA GAC CTC AC 3'

G8: 5' GCT TGG ACT CAG AAT AAT CC 3'

โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 จะได้ท่อนพีซีอาร์ขนาด 1.4 kb

0.2 µg DNA

10xPCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin)

Taq DNA polymerase (5 U/μl) (Perkin-Elmer-Cetus)

1.25 mM each dNTP

1.5% agarose gel และ ethidium bromide (1 μg/ml)

TAE buffer

วิธีทำ

1. ผสมสารต่อไปนี้เข้าด้วยกันในปริมาตรรวม 50 μl

   0.2 μg DNA

   5.0 μl 10xbuffer

   200 nM each dNTP

   15 pmol of each primer

   2.5 unites of *Taq* polymerase

2. โปรแกรมการทำพีซีอาร์ (PCR cycles)

   รอบที่ 1 : denature ที่ 95°C เป็นเวลา 7 นาที

   รอบที่ 2-30 : denature ที่ 95°C เป็นเวลา 1 นาที

   annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 1 นาที

   extension ที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที

   รอบที่ 31 : extension ที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

3. นำผลพีซีอาร์ 3-5 μl มาทำ 1.5% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อตรวจสอบผลที่ได้

3.3.2 วิธีติดฉลากโอลิโกโพรบด้วยดิออกซิจินิน

น้ำยา

Oligonucleotide Probes (ตารางที่ 4)

Dig oligonucleotide labeling kit (Boehringer, Mannheim, Germany)

0.25 M EDTA

วิธีทำ

1. ใช้โอลิโกโพรบ 100 pmol ผสมกับ 1 nmol Dig-ddUTP และ 50 units terminal transferase ใน tailing buffer แล้ว incubate ที่ 3°C เป็นเวลา 15 นาที (ทำตามคู่มือที่ให้มากับน้ำยา)

2. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 2 μl ของ glycogen solution (glycogen solution 2 μl และ 0.2 M EDTA, pH 8.0 200 μl)

3. ตกตะกอนโอลิโกโพรบที่ติดฉลากด้วยดิออกซิจินินด้วย 4 M LiCl และ

absolute ethanol แล้วละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นประมาณ 2 pmol/µl

3.3.3 วิธี hybridization และ detection

น้ำยา

Digoxigenin detection kit (Boehringer, Mannheim, Geramany)

nylon filter membranes (Hybond-N™, Amersham)

Bio-Dot apparatus (Bio-Rad)

3xSSPE (0.54 M NaCl, 30 mM NaH_2PO_4 pH 7.4, 3 mM EDTA pH 7.4)

5xDenhardt's solution (0.1% BSA, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% ficoll)

Hybridization buffer (3xSSPE, 5xDenhardt's solution และ 0.5% SDS)

Washing buffer (2xSSPE and 0.1%SDS)

Incubation buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl และ 0.3% Tween 20)

วิธีทำ

1. ใช้พีซีอาร์ 10 µl ผสมกับ TE buffer 90 µl แล้ว denature ด้วยส่วนผสมของ 0.2 NaOH และ 0.25 M EDTA 400 µl ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

2. นำมาหยดลงบนแผ่นไนลอนโดยใช้ Bio-Dot apparatus หลุมละ 250 µl 2 หลุม สำหรับ normal probe 1 หลุม และ mutant probe อีก1 หลุม แล้ว vacuum จนแห้ง

3. เมื่อแผ่นไนลอนแห้งนำไปอบที่ 80°C นาน 1 ชม หรือ ใช้ UV light box เพื่อตรึงดีเอ็นเอกับแผ่นไนลอน

4. นำแผ่นไนลอนมา prehybridize โดยแช่ใน hybridization buffer ในถุงพลาสติก(1 ml ต่อพื้นที่เมมเบรน 20 cm^2 และ incubate ที่ 42°C เป็นเวลา 30 นาที

5. เติม Dig-labeled oligoprobe ประมาณ 2-5 pmol ต่อ 5 มล ของ hybridization buffer แล้ว incubate ที่ 42°C เป็นเวลา 1 ชม

6. เก็บ hybridization buffer ที่มีโอลิโกโพรบ ที่ -20°C เพื่อนำไปใช้อีก ส่วนแผ่นไนลอนนำมา rinse ด้วย washing buffer 2-3 ครั้ง

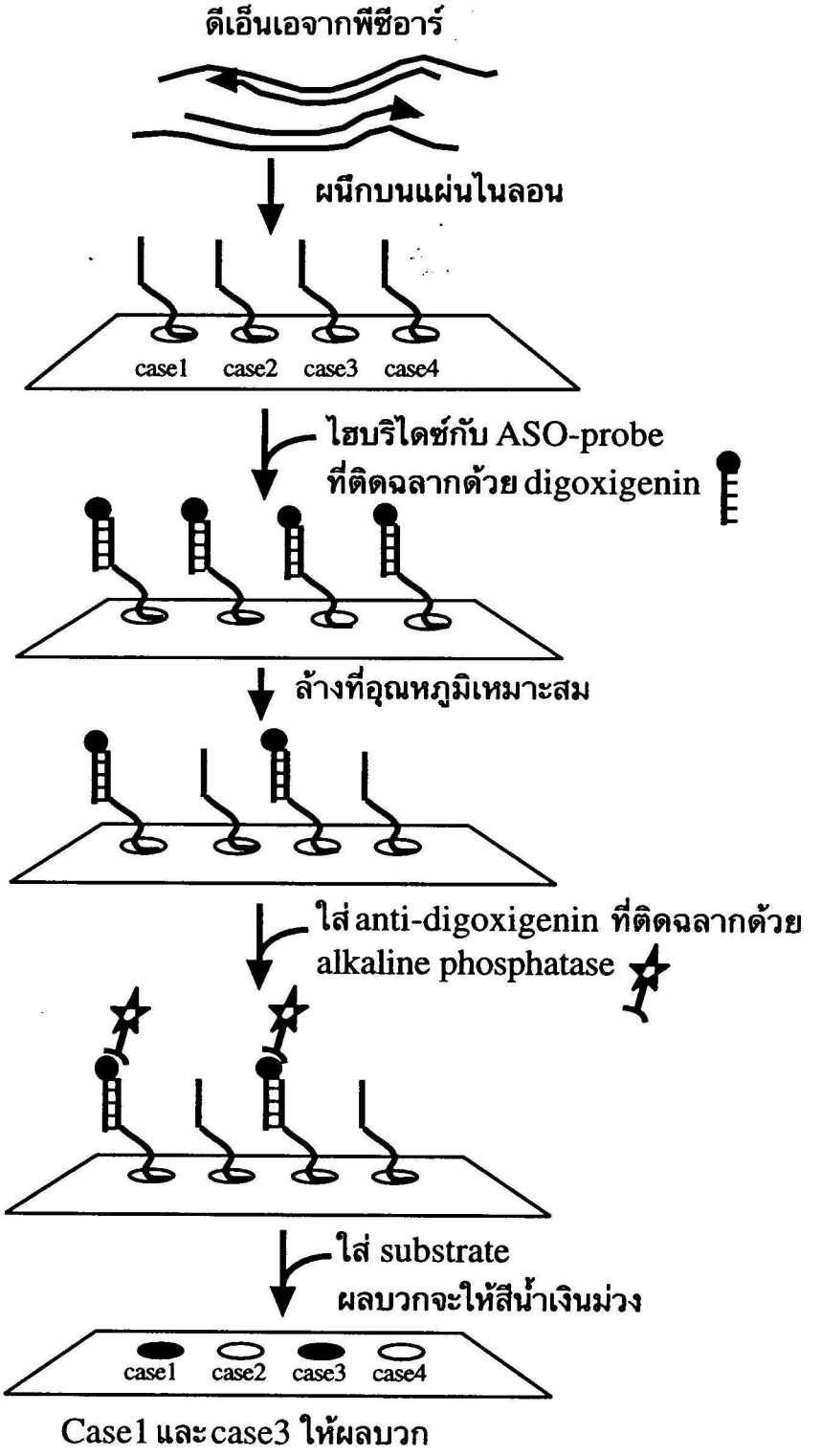
7. ล้างครั้งสุดท้าย (stringency wash) ด้วย washing buffer ที่อุณหภูมิเหมาะสม (ขึ้นอยู่กับ Tm ของโอลิโกโพรบ) เป็นเวลา 10 นาที

8. นำแผ่นไนลอนมา incubate กับ alkaline phosphatase-conjugated anti-Dig ใน incubation buffer (150 mU/ml) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม

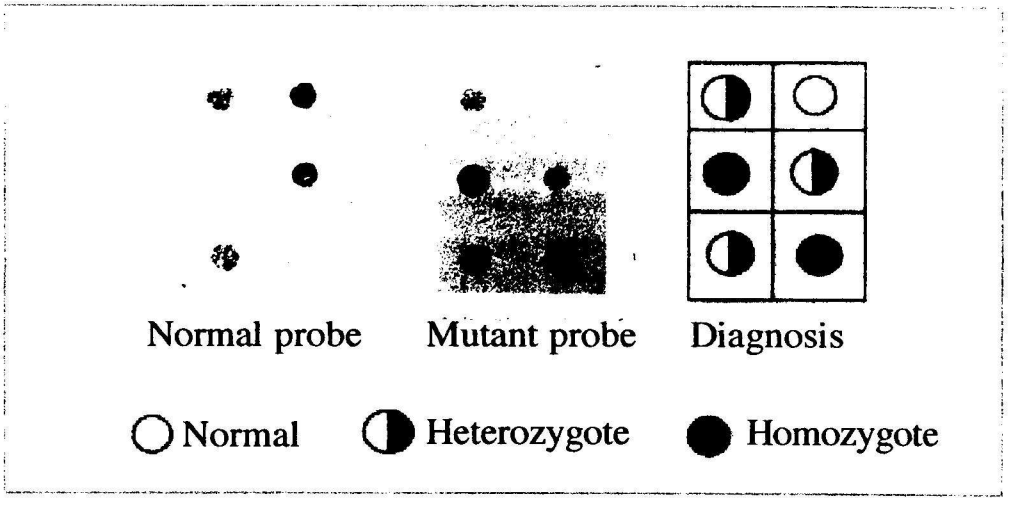
9. ล้างแผ่นไนลอนด้วย incubation buffer 2 ครั้งๆละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง incubate กับ enzymatic substrate (NBT and X-phosphate) จนมีสีสีม่วงเข้มดังแสดงในรูปที่ 5

ตารางที่ 4 *ลำดับเบสของโอลิโกโพรบและ washing temperature สำหรับใช้ตรวจมิวเตชั่นของบีต้าธาลัสซีเมียชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย*

Position/ Mutation		Sequence (5' ----------> 3')	Washing temp. (°C)
-86 C-G	normal, sense	GCCACACCCTAGGGTTGGC	64
	mutant, antisense	GCCAACCCTACGGTGTGGC	64
-28,-29 ATAAA	normal, sense	GGCTGGGCATAAAAGTCAG	60
-28 ATAGA	mutant, antisense	GCCCTGACTTCTATGCCCA	60
-29 ATGAA	mutant, antisense	GCCCTGACTTTCATGCCCA	60
cap site A-C	mutant, sense	GCCATCTATTGCTTACATT	52
	normal, antisense	AATGGAAGCAATAGATGGC	54
Cod8/9 +G	normal, sense	TCCTGAGGAGAAGTCTGCC	60
	mutant, sense	TGAGGAGAAGGTCTGCCGT	60
Cod 15,16,17,19	normal, sense	TGTGGGGCAAGGTGAACGT	60
15 +G	mutant, sense	TTACTGCCCTGTGGGGGCA	60
15 -T	mutant, sense	TTACTGCCCTGGGGGCAAG	62
15 TGG-TAG	mutant, sense	TGTAGGGCAAGGTGAACGT	58
16 -C	mutant, sense	TGTGGGGAAGGTGAACGTG	60
17 AAG-TAG	mutant, sense	TGTGGGGCTAGGTGAACGT	60
19 AAC-AGC	mutant, sense	GCAAGGTGAGCGTGGATGA	60
cod 26, 27, 28	normal, antisense	AGGGCCTCACCACCAACTT	60
HbE GAG-AAG	mutant, sense	AAGTTGGTGGTAAGGCCCT	58
26 GAG-TAG	mutant, sense	AAGTTGGTGGTTAGGCCCT	58
27/28 +G	mutant, antisense	ACCTGCCCAGGGGCCTCA	62
IVS 1 #1, 5	normal, sense	GGTTGGTATCAAGGTTACA	56
1 G-A	mutant, sense	CAGATTGGTATCAAGGTTA	52
1 G-T	mutant, antisense	GTAACCTTGATACCAAACT	54
5 G-C	mutant, sense	GGTTGCTATCAAGGTTACA	56
Cod 35	normal, antisense	GTCCAAGGGTAGACCACCA	60
TAC-TAA	mutant, sense	GGTGGTCTAACCTTGGACC	60
Cod 41,42,43	normal, sense	ACCCAGAGGTTCTTTGAGT	56
41 -C	mutant, sense	ACCCAGAGGTTTTTGAGTC	56
41/42 -TCTT	mutant, sense	ACCCAGAGGTTGAGTCCTT	58
43 GAG-TAG	mutant, sense	GGTTCTTTTAGTCCTTTGG	54
Cod 71/72	normal, sense	TCGGTGCCTTTAGTGATGG	58
71/72 +A	mutant, sense	GTGCCTTTAAGTGATGGCC	58
IVS2#654	normal, sense	TGGGTTAAGGCAATAGCAA	54
IVS2#654 (C-T)	mutant, antisense	TGCTATTACCTTAACCCAG	54



รูปที่ 4 *แสดงขั้นตอนการทำไฮบริไดเซชั่นของโลโกโพรบที่ติดฉลากด้วยดิกออกซิจินิน*



รูปที่ 5 ตัวอย่างการอ่านผลโอลิโกโพรบไฮบริไดเซชั่นจากดีเอ็นเอของผู้ป่วย 6 ราย เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิดโคดอน 19(AAC-AGC) ผลปรกติ 1 ราย โฮโมไซโกต 2 ราย และ เฮทเตอร์โรไซโกต 3 ราย

หมายเหตุ 1. การทดลองครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีที่ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี โดยใช้ดิกออกซิจินินติดฉลากกับโพรบแทน ^{32}P ขั้นตอนต่างๆสามารถทำได้เช่นเดียวกับการใช้สาร ^{32}P สามารถใช้โพรบซ้ำได้ทำให้วิธีทำสะดวก ปลอดภัย และลดต้นทุนการตรวจ

2. น้ำยามีความคงทน เก็บไว้ที่ -20°C ได้นานหลายปี อย่างน้อย 5 ปี ยังไม่เสื่อมสภาพ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจในการตรวจประจำวัน

3. ผลการตรวจมีความไวและความจำเพาะเช่นเดียวกับการใช้สารกัมมันตรังสี

4. สามารถควบคุมคุณภาพการตรวจได้โดยตรวจดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกและผลลบบนแผ่นไนลอนแผ่นเดียวกันกับดีเอ็นเอของผู้ป่วย

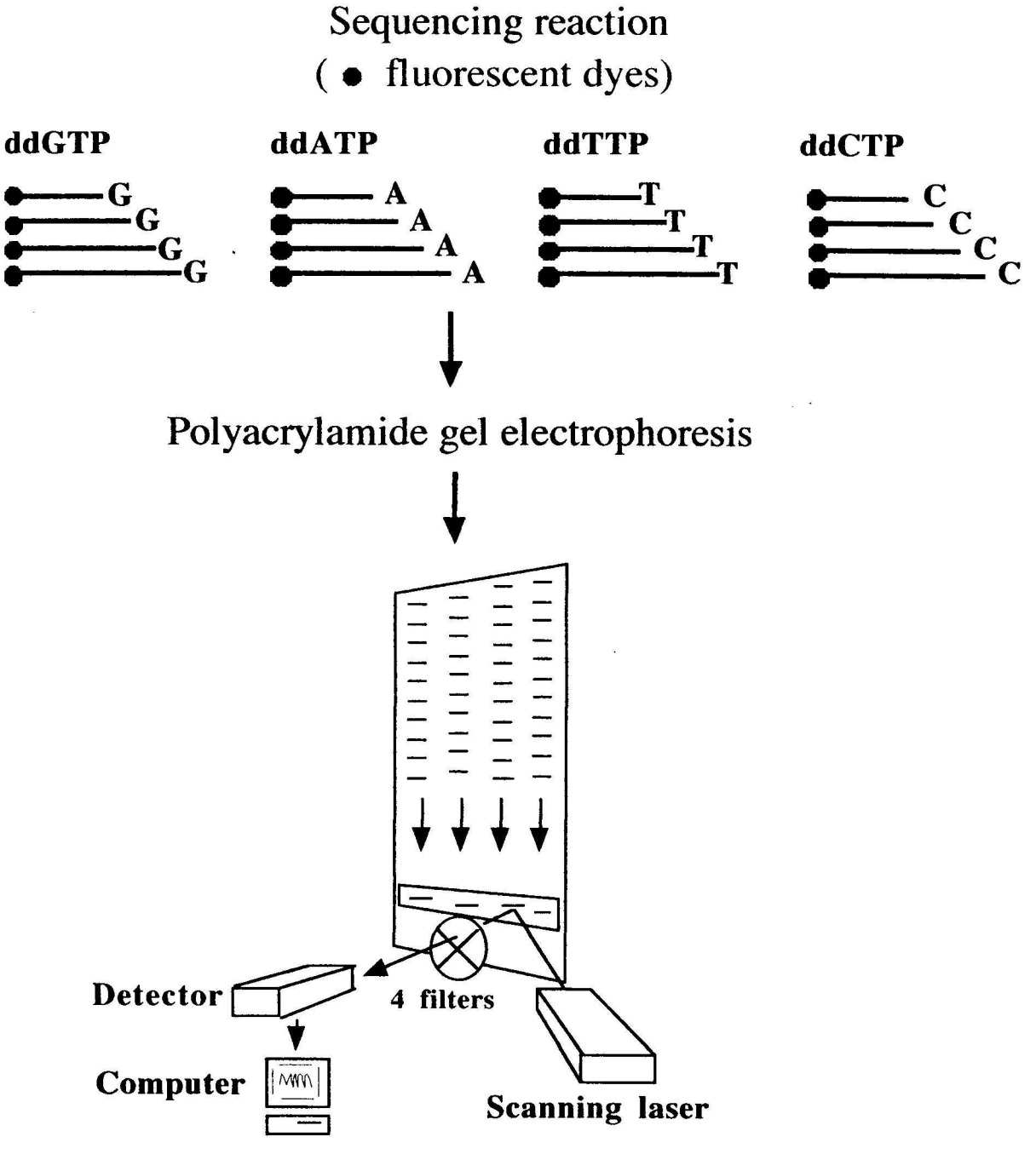
5. ข้อเสียคือต้องใช้เวลาในแต่ละขั้นตอนยาวนาน และไม่สามารถตรวจหลาย mutation บนแผ่นไนลอนเดียวกัน

3.4 วิธีตรวจหาลำดับเบสด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (Automated DNA sequencing)

วิธีหาลำดับเบส (DNA sequencing) ที่นิยมใช้กันมากคือวิธีของ Sanger และคณะ ที่เรียกว่าวิธี chain termination และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาให้สามารถใช้ร่วมกับเครื่องมืออัตโนมัติ ทำให้การอ่านผลและวิเคราะห์ผลทำได้สะดวกมากขึ้น และไม่จำเป็นต้องใช้สารกัมมันตรังสีอีกต่อไป แต่ข้อเสียคือเครื่องมือและน้ำยาราคาแพง

ขั้นตอนในการทำจะเหมือนกับการทำ manual sequencing โดยนำดีเอ็นเอที่จะศึกษาซึ่งอาจใช้ดี

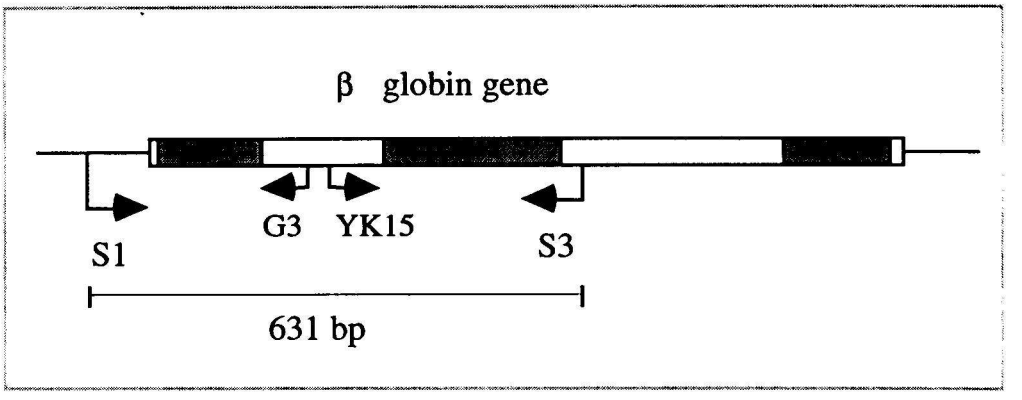
เอ็นเอที่ได้จากการทำโคลนนิ่ง (cloning) หรือดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากการทำพีซีอาร์ มาสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ด้วยเอ็นซัยม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างได้จะถูกจำกัดความยาวโดย dideoxy nucleotides ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ตัว คือ ddATP หรือ ddGTP หรือ ddCTP หรือ ddTTP โดย dideoxy nucleotides แต่ละตัวจะ label ด้วย fluorescent dye ที่ต่างกัน ทำให้สามารถทำ reaction ใน tube เดียวกันได้ และดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่นี้จะมีความยาวต่างกัน 1 เบส ตลอดความยาวของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เมื่อนำปฏิกิริยาที่ได้ไปทำอิเล็คโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นที่มีความละเอียดสูง (polyacrylamide gel electrophoresis) ทำให้สามารถอ่านลำดับของเบสได้ ซึ่งในขั้นตอนการทำอิเล็คโตรโฟรีซิสจะใช้เครื่องมืออัตโนมัติ (automated DNA sequencing) ที่มี laser scanning และ detector เป็นตัวอ่านและแปลงข้อมูล แล้วส่งข้มูลไปเก็บในเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมสำเร็จรูปช่วยในการอ่านและวิเคราะห์ผล ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 *ขั้นตอนการหาลำดับเบสด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (fluorescence-based automated DNA sequencing)*

3.4.1 วิธีการเตรียม DNA template

นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ S1 และ G8 ตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 2 บนบีตา โกลบินแสดงในไดอะแกรมรูปที่ 7



รูปที่ 7 *แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้หาลำดับเบสบริเวณเอ็กซอน 1 และ เอ็กซอน 2 ของจีนบีตาโกลบิน*

น้ำยา

primers :

S1: 5' TGT CAT CAC TTA GAC CTC AC 3'

S3: 5' TCC CAT AGA CTC ACC CTG AA 3 หรือ

G8: 5' GCT TGG ACT CAG AAT AAT CC 3'

Low melting agarose gel

TE buffer pH 8.0

Phenol และ chloroform

3 M sodium acetate pH 5.8

วิธีทำ

1. ใช้ double-stranded DNA จากพีซีอาร์ของไพรเมอร์ S1-S3 หรือ S1-G8 ของ β-globin gene
2. นำพีซีอาร์ดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิโดยวิธี Freezing-Squeezed method
3. ใช้พีซีอาร์ 20 µl ทำอิเลคโตรโฟรีซิสบน 1% LMP agarose gel ที่ 50 volt โดยใช้ 1xTAE buffer
4. ย้อมด้วย ethidium bromide และตัดแบนที่ต้องการ มาใส่ใน microtube และเติม TE buffer 150 ml ต้มที่ 70°C จนเจลละลายหมด

5. เติม phenol 200 ml ผสมโดยกลับ tube ไปมา แล้วแช่ที่ -70°C หรือ dry ice เป็นเวลา 20 นาที
6. นำมาปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสใส่ tube ใหม่
7. เติม chloroform 350 µl ผสมด้วยโดยกลับ tube ไปมา แล้วปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
8. เก็บส่วนใสมาเติม Sod. Acetate ในปริมาตร 1/10 เท่า 1 และ absolute ethanol 2 1/2 เท่า แช่ที่ -70°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บตะกอนละลายในน้ำกลั่น ใช้ประมาณ 500 ng ในการทำ ds-template sequencing

3.4.2 วิธีทำปฏิกิริยา sequencing โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler

น้ำยาและเครื่องมือ

Applied Biosystems Automated DNA Sequencer, Model 373A

Perkin-Elmer Cetus thermal cyclers Model 480 (ramping time at 1°C/second)

DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit (PRISM™ Ready Reaction, Applied Biosystems)

Sequencing primers : G3: 5' GCC CAG TTT CTA TTG GTC TC 3' หรือ
YK15: 5' TAG GCA CTG ACT CTC TGC CT 3'

2 M sodium acetate pH 4.5

Loading buffer (ผสม deionized formamide 5 ml และ 50 mM EDTA 1 ml)

วิธีทำ

1. ผสมน้ำยาต่อไปนี้ใน PCR microtube

Terminator Premix	9.5	µl
ds PCR-DNA template	9.5	µl (~500 ng)
Sequencing primer	1.0	µl (3.2 pmol)
Total volume	20.0	µl

2. ตั้งอุณหภูมิของเครื่องพีซีอาร์ให้ได้ 96°C ก่อนเริ่ม PCR cycle
3. ทำพีซีอาร์ทั้งหมด 25 รอบ โดยใช้โปรแกรม 96°C, 30 นาที; 50°C, 15 นาที และ 60°C, 4 นาที
4. ตกตะกอนผลที่ได้ด้วย 2 M sod. acetate15 µl และ absolute ethanol 300 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
6. นำตะกอนมาละลายใน loading buffer 4 µl

7. ต้มที่ 90°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ก่อน load gel

3.4.3 การเตรียม 6% polyacrylamide gel

น้ำยา

10 X TBE (1 ลิตร ประกอบด้วย tris base 107.8 กรัม, boric acid 55.0 กรัม, Na_2EDTA 8.2 กรัม และปรับ pH ให้ได้ 8.3

40% Acrylamide (19:1 Acrylamide : Bis-acrylamide)

10% Ammonium Persulfate (APS) (w/v)

urea

TEMED

วิธีทำ

1. ผสมน้ำยาต่อไปนี้

Urea	40	กรัม
40% acrylamide	12	มล
10xTBE	8	มล

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 65-70 มล

2. ต้มที่ 50-70°C และคนให้เข้ากันจน urea ละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 80 มล

3. กรองผ่าน nitrocellulose filter (ขนาด 0.45 μm)

4. เติม 10% APS 400 μl และ TEMED 45 μl ผสมให้เข้ากันก่อนเทในกระจกที่เตรียมไว้

5. ปล่อยให้ polymerize ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 2 ชม และต้องใช้ภายใน 48 ชม

6. นำมาประกอบกับเครื่อง sequencing โดยใช้ 1 x TBE buffer เป็น electrophoresis buffer

7. ตรวจดูความสะอาดของ gel และ กระจกโดยใช้ plate check function ก่อน prerun เป็นเวลา 30 นาที

3.4.4 การทำอิเล็คโตรโฟรีซิสและเก็บวิเคราะห์ข้อมูล

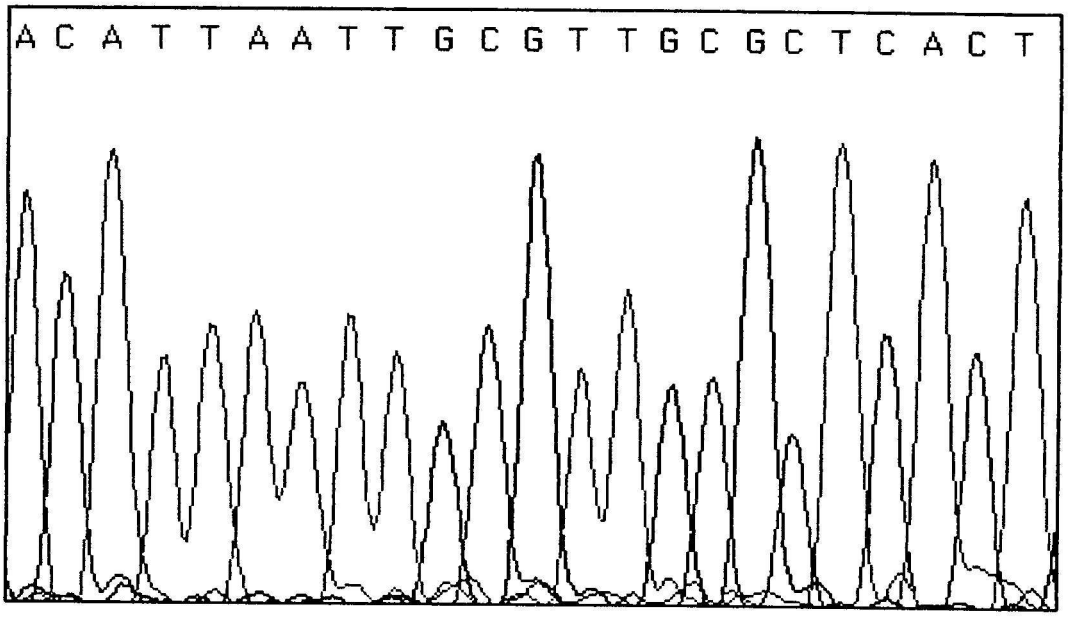
1. หลังจากต้ม sequencing reaction ที่ 90°C นาน 2 นาที นำมา load gel โดยใช้ automatic pipet ประมาณ 3-4 μl ต่อ well

2 ทำอิเล็คโตรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 30 watt (ประมาณ 1,000-1,600 V, 18-21 mA สำหรับ 6% PAGE) ที่ 40°C เป็นเวลา 10-14 ชม ขึ้นอยู่กับความยาวของ template โดย

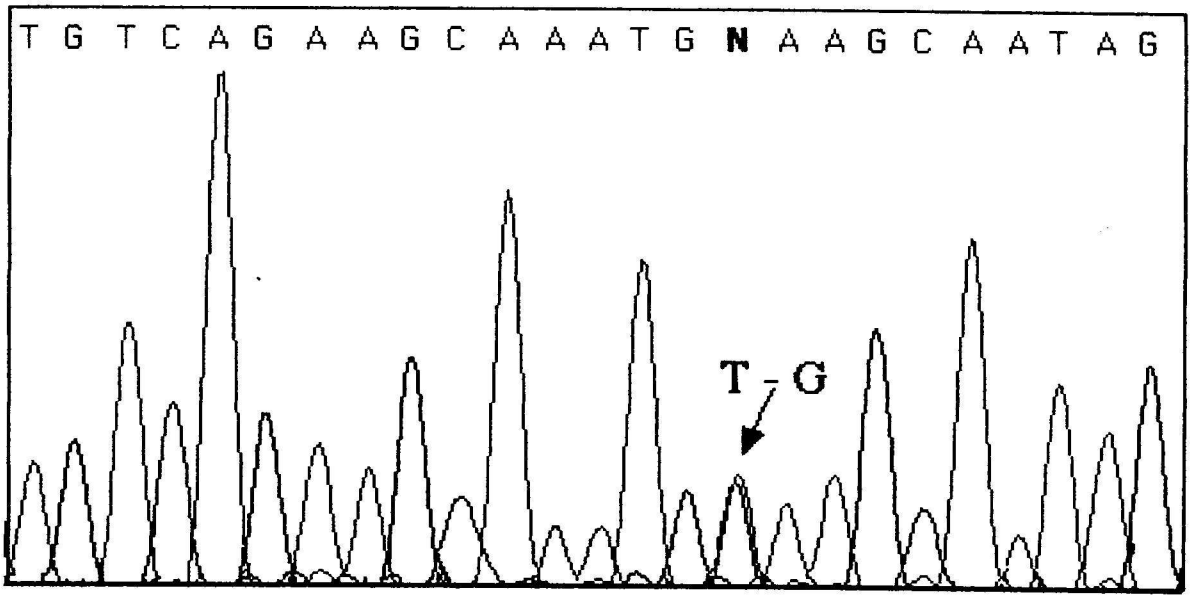
ทั่วไปจะอ่านได้ประมาณ 300 - 500 เบส

3. ขณะเดียวกันเปิดโปรแกรม data collection ในเครื่องคอมพิวเตอร์ และเลือกปุ่ม collect เพื่อเก็บข้อมูล

4. หลังจากทำอิเล็คโตรโฟรีซิส จะใช้โปรแกรม data analysis เพื่อวิเคราะห์ข้อมูล (ขั้นตอนนี้สามารถ set ให้เครื่องคอมพิวเตอร์ทำเองโดยอัตโนมัติ) ข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จะแสดงเป็น chromatogram ดังแสดงในรูปที่ 8 ถ้ามี mutation เกิดขึ้นหรือมีเบสเปลี่ยนแปลงไปเพียงอัลลีลเดียว (heterozygote) จะมี peak ของ chromatogram ที่ตำแหน่งนั้นซ้อนกัน และโปรแกรมจะอ่านเบสเป็น N ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 8 *ตัวอย่าง chromatogram ที่อ่านได้จากเครื่องอัตโนมัติโดยใช้โปรแกรม data analysis ของ ABI*



รูปที่ 9 *ตัวอย่าง chromatogram ที่มี mutation เกิดขึ้น ตรงลูกศรชี้มีเบส T เปลี่ยนเป็น G (Cap site mutation) ผู้ป่วยรายนี้เป็นพาหะ (heterozygote) ของ mutation ชนิดนี้*

3.5 วิธีตรวจจีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA

แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ที่พบบ่อยในคนไทย เกิดจากจีนแหว่ง 17.5 กิโลเบส การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสามารถทำได้ง่าย โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ครอ่มรอยต่อของจีนที่แหว่งหายนั้น แล้วอ่านผลจากการทำอิเลคโตรโฟริซิสและย้อมด้วยสารเอทิเดียมโบรไมด์

สารเคมีและน้ำยา

1. DNA ตัวอย่าง
2. ไพรเมอร์ เจือจางให้มีความเข้มข้น 20 pmol/μl
   A4 : 5' GGG GCG CCT TGG GGA GGT TC 3'
   A1B : 5' GTT CCC TGA GCC CCG ACA CG 3'
   A9 : 5' ATA TAT GGG TCT GGA AGT GTA TC 3'
3. 10xPCR buffer (มี 25 mM $MgCl_2$), Taq polymerase และ dNTPs (Perkin-Elmer)
4. 2% Agarose gel และ ethidium bromide (1 μg/ml)

วิธีการ

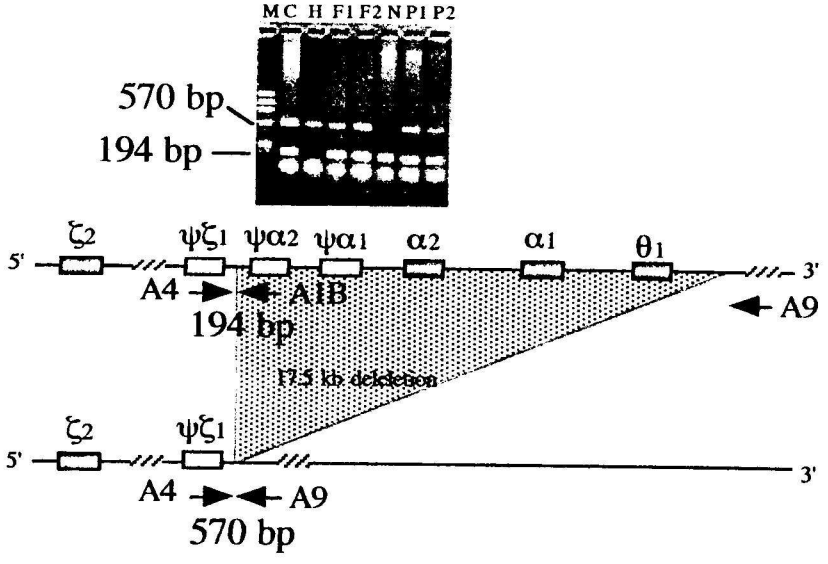
1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

DNA	8	µl (~400-500 ng)
10xPCR buffer	2	µl
2 mM dNTPs	2	µl
primer A4	0.5	µl
primer A1B	0.25	µl
primer A9	0.5	µl
Taq DNA polymerase	0.1	µl
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	20	µl

2. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR condition)

รอบที่ 1	denaturation	95°C	5 นาที
	annealing	63°C	2 นาที
	extension	72°C	2 นาที
รอบที่ 2-34	denaturation	95°C	1 นาที
	annealing	63°C	2 นาที
	extension	72°C	2 นาที
รอบที่ 35	denaturation	95°C	5 นาที
	annealing	63°C	2 นาที
	extension	72°C	10 นาที

3. นำดีเอ็นเอที่ได้จากพีซีอาร์ 7 µl ไปทำ 2% agarose gel eclectrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide อ่านผลแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 *ตัวอย่างการอ่านผลพีซีอาร์หลังจากทำอิเล็กโตรโฟริซิสบนแผ่นวุ้น เพื่อวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA (M = DNA marker; C = carrier; H = Hb Bart's hydrop fetalis; N = normal; F1, F2, P1, P2 = patients) และไดอะแกรมแสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์และตำแหน่งของจีนที่ขาดหายไปประมาณ 17.5 กิโลเบส*

A4, A1B และ A9 คือพีซีอาร์ไพรเมอร์ ถ้าเป็นจีนปรกติจะได้ผลพีซีอาร์ระหว่างไพรเมอร์ A4 กับ A1B ขนาด 194 เบส และถ้าเป็นจีน SEA จะได้ผลพีซีอาร์ระหว่างไพรเมอร์ A4 กับ A9 ขนาด 570 เบส

3.6. วิธีตรวจจีนบีตาธาลัสซีเมียชนิดจีนแหว่ง 3485 เบส

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของจีนบีตาธาลัสซีเมียชนิดจีนแหว่ง 3485 เบส สามารถทำได้ง่าย โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้คร่อมรอยต่อของจีนที่แหว่งหาย แล้วอ่านผลโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสและย้อมด้วยสารเอทิเดียม โบรไมด์

<u>สารเคมีและน้ำยา</u>

1. DNA ตัวอย่าง
2. ไพรเมอร์ เจือจางให้มีความเข้มข้น 30 pmol/µl

   G9 : 5' TCC CCA GTT AAC CTC CTA TT 3'

   N1 : 5' CAC ATA TGA GCA AGG TTG TG 3'

   N2 : 5' TAT CAC TAA GCT CGC TTT CT 3'
3. 10xPCR buffer และ Taq polymerase, dNTPs (Perkin-Elmer)

4. 2% Agarose gel และ ethidium bromide (1 mg/ml)

<u>วิธีการ</u>

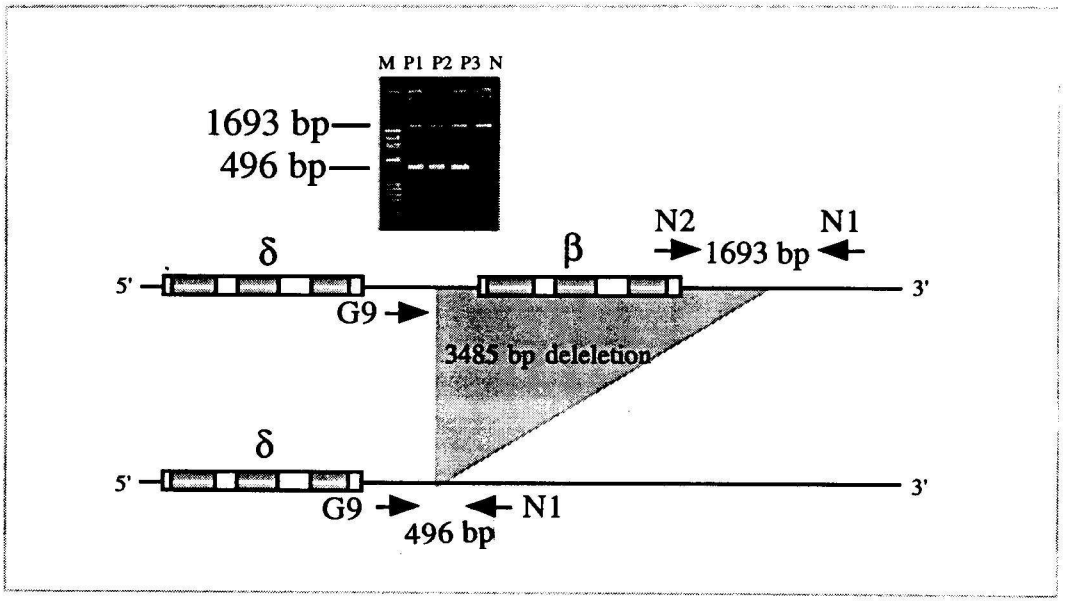
1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

DNA	8	µl (~400-500 ng)
10xPCR buffer	2	µl
2.5 mM dNTPs	3.2	µl
primer G9	0.2	µl
primer N1	0.2	µl
primer N2	0.2	µl
Taq DNA polymerase	0.1	µl
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	20	µl

2. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR condition)

รอบที่ 1	denaturation	95°C	5 นาที
รอบที่ 2-30	denaturation	95°C	1 นาที
	annealing	55°C	1 นาที
	extension	72°C	2 นาที
รอบที่ 31	extension	72°C	7 นาที

3. นำดีเอ็นเอที่ได้จากพีซีอาร์ 5 µl ไปทำ 1.5% agarose gel eclectrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide อ่านผลแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 *ตัวอย่างการอ่านผลพีซีอาร์หลังจากทำอิเล็กโตรโฟริซิสบนแผ่นวุ้น เพื่อวินิจฉัยบีตาธาลัสซีเมียชนิดจีนแหว่ง 3485 เบส (M = DNA marker; P1-P3 = carrier; N = normal) และไดอะแกรมแสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์และตำแหน่งจีนที่ขาดหายไป 3485 เบส*

G9, N1 และ N2 คือพีซีอาร์ไพรเมอร์ ถ้าเป็นจีนปรกติจะได้ผลพีซีอาร์ระหว่างไพรเมอร์ N1 กับ N2 ขนาด 1693 เบส และถ้าเป็นจีนที่กลายพันธุ์ จะได้ผลพีซีอาร์ระหว่างไพรเมอร์ G9 กับ N1 ขนาด 496 เบส

4. การพัฒนาการตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

<u>การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยผู้เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ทางอิมมูโนวิทยา (ELISA)</u>

แอลฟาธาลัสซีเมียเป็นภาวะผิดปรกติทางพันธุกรรมที่พบบ่อยในประเทศไทย ประมาณร้อยละ 5-30 ของประชากรในภาคต่างๆ เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดใดชนิดหนึ่ง โรคธาลัสซีเมียที่เกิดจากความผิดปรกติของจีนอัลฟาที่สำคัญมี 2 ชนิดคือ โรคฮีโมโกลบินเอ็ช ผู้ป่วยจะมีอาการซีด เหลือง ตับม้าม โต อาการของโรคมีความรุนแรงแตกต่างกันตั้งแต่มีความรุนแรงน้อยไปจนถึงค่อนข้างรุนแรง ในประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคนี้ประมาณ 4.2 แสนคน อีกชนิดหนึ่งคือ โรคทารกบวมน้ำชนิดมีฮีโมโกลบินบาร์ท (hemoglobin Bart's hydrops fetalis) เป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงมากที่สุด ทารกจะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์ หรือเสียชีวิตหลังคลอดภายใน 24 ชั่วโมง และที่สำคัญคือกว่าร้อยละ 70 ของ

มารดาที่ตั้งครรภ์ทารกบวมน้ำชนิดนี้ จะมีอาการครรภ์เป็นพิษ (toxemia of pregnancy)

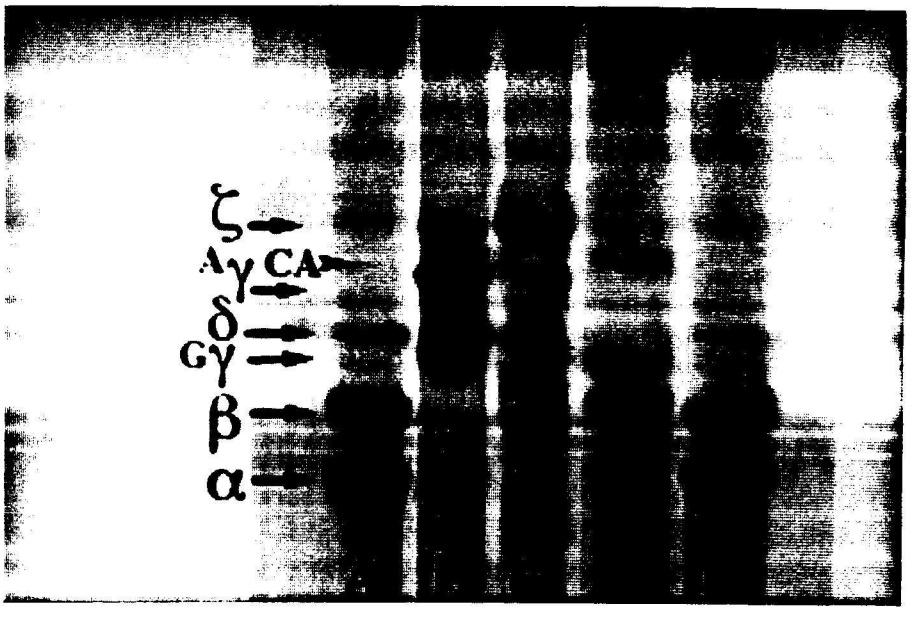
แอลฟาธาลัสซีเมีย จึงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย การแก้ปัญหาดังกล่าว ต้องเริ่มต้นที่การตรวจวินิจฉัยพาหะที่แม่นยำ ค่าใช้จ่ายต่ำ ทำได้หลายรายต่อครั้ง และขั้นตอนวิธีทำไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมียโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (ELISA) เพื่อนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยพาหะของโรคแอลฟาธาลัสซีเมียที่สำคัญดังกล่าว โดยตรวจหาฮีโมโกลบินบาร์ท ฮีโมโกลบินเอ็ชและซีต้า-โกลบิน ในเลือดของผู้เป็นพาหะ

วิธีการศึกษา

1. <u>การเตรียมฮีโมโกลบินและโกลบิน</u>

1.1 ฮีโมโกลบินพอร์ทแลนด์ ($\zeta_2\gamma_2$) ฮีโมโกลบินบาร์ทส์ (γ_4) และฮีโมโกลบินเอ็ช (β_4) เตรียมได้จากฮีโมโกลบินของทารกบวมน้ำแบบมีฮีโมโกลบินบาร์ทส์ และทำให้บริสุทธิ์โดยกรองผ่าน DEAE-cellulose column chromatography โดยใช้น้ำยา glycine/KCN/NaCl

1.2 นำแต่ละส่วนที่แยกได้ในข้อ 1.1 มาตรวจสอบโดยวิธี Triton-X/acid urea/ polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมด้วยน้ำยา Coomassic blue ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 *แสดงภาพถ่าย Triton X-100/urea/polyacrylamide gel electrophoresis ของ hemolysates จาก ผู้ใหญ่ปรกติ (A และ E); Hb Barts hydrops fetalis (B); ส่วนที่ 1 (C) และส่วนที่ 2 (D) จาก DEAE-cellulose column chromatography*

2. การเตรียมแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินและโกลบิน

2.1 ฉีดกระตุ้นกระต่าย (White New Zealand rabbits น้ำหนักประมาณ 3-4 กก.) ด้วยฮีโมโกลบินหรือโกลบินที่แยกได้ในข้อ 1 โดยฉีดกระตุ้นซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง

เริ่มต้น (วันที่ 1) ด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังด้วยแอนติเจนที่ผสมใน Freund's adjuvant (แอนติเจน 0.05 มล. ประมาณ 50 มก. ผสมกับ Freund's adjuvant 1 มล.) ข้างละ 0.5 มล. และตามด้วยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำหลาย ๆ ครั้งด้วยช่วงเวลาที่เหมาะสม แอนติเจนที่ใช้ฉีดเข้าหลอดเลือดดำเป็นฮีโมโกลบินหรือโกลบินที่ผสมในน้ำเกลือ (NSS) โดยฉีด

วันที่ 24 ฉีด 0.2 มล. เข้าใต้ผิวหนัง หลังจากนั้น 30 นาที ฉีด 0.2 มล. เข้าเส้นเลือดดำ

วันที่ 26 ฉีด 0.5 มล. เข้าเส้นเลือดดำ

วันที่ 28 ฉีด 1.5 มล. เข้าเส้นเลือดดำ

วันที่ 31 ฉีด 2.0 มล. เข้าเส้นเลือดดำ

วันที่ 33 ฉีด 3.0 มล. เข้าเส้นเลือดดำ

2.2 เก็บรวบรวมซีรั่มซึ่งได้ทดสอบหาระดับของแอนติบอดีโดยวิธี Ouchterlony double diffusion นำมาแยกแอนติบอดี้ และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี adsorption affinity chromatography ซึ่งใช้ cyanogen bromide-activated sepharose 4B coupled with normal cord blood hemolysate

3. การเก็บตัวอย่างเลือด

กลุ่มที่ 1 : obligatory-α-thalassemia 1 เก็บรวบรวมจากบิดาและมารดาของทารกที่เป็น Hb Bart's hydrop fetalis

กลุ่มที่ 2 : heterozygotes-α-thalassemia 1 เก็บรวบรวมจากบิดาและมารดาของลูกที่เป็นโรคฮีโมโกลบินเอ็ช และให้ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาผิดปรกติ

กลุ่มที่ 3 : แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 เก็บรวบรวมจากบิดาและมารดาของลูกที่เป็นโรคฮีโมโกลบินเอ็ช และให้ผล การตรวจเลือดทางโลหิตวิทยาปรกติ

กลุ่มที่ 4 : โรคฮีโมโกลบินเอ็ช เก็บรวบรวมจากผู้ที่ให้ผลบวก จากการตรวจ inclusion body และ electrophoresis

กลุ่มที่ 5 : ตัวอย่างเลือดเก็บรวมรวบจากผู้ป่วยที่มีความผิดปรกติของฮีโมโกลบินและธาลัสซีเมียชนิดอื่น เช่น เบต้า-ธาลัสซีเมีย, ฮีโมโกลบินอี ฯลฯ

กลุ่มที่ 6 : เลือดตัวอย่างของคนปรกติ เก็บรวมรวบจากผู้ใหญ่ปรกติที่มาตรวจที่ ร.พ.สงขลานครินทร์

4. การพัฒนาวิธี ELISA

นำน้ำเลือด (hemolysate) ตัวอย่างมาเจือจางใน coating buffer และ coat microplate ที่ 37°C 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย washing buffer (0.05% Tween -20, PBST) เพื่อเอาแอนติเจนส่วนเกินออก จากนั้น block emty sites ใน plate โดย incubate กับ 1% BSA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง BSA ส่วนเกินออกก่อนเติมแอนติบอดี้ที่เตรียมจากข้อ 2 ในแต่ละหลุมด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเว้นหลุมสุดท้ายของแต่ละแถวเอาไว้โดยเติมเฉพาะ PBST ซึ่งใช้เป็น Blank แล้วนำไป incubate ที่ 37°C

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้งก่อนเติม alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit (หรือ mouse) immunoglobulin แล้ว incubate ที่ 37°C 1 ชั่วโมง หลังจากล้างด้วย PBST 3-5 ครั้ง เติม substrate ที่เหมาะสม แล้ว incubate 30 นาที จึงหยุดปฏิกิริยา นำไปอ่านค่า optical density โดยเทียบกับค่า blank

5. การวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผล ตรวจสอบ specificity และ sensitivity ของแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆกันของ HbA, HbF, HbA_2, และ HbE

<u>สรุปขั้นตอนการทำ ELISA</u>

Antigens (HbA, HbF, HbA_2, HbE) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน 50 mM Sodium Carbonate pH 9.6

↓

Coated microtiter plate (Nunc, Denmark)

↓

washed

↓

Incubated with antibodies

↓

washed

↓

Incubated with anti-mouse IgG conjugated with HRP

↓

washed

↓

added enzymatic color substrates (TMB)

↓

Stop reaction ด้วย 2 M H_2SO_4

↓

อ่านค่า OD ที่ 450 nm

ผลการวิจัย

1. ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาและผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

จากตัวอย่างจำนวน 300 ราย ที่มารับบริการตรวจเลือดที่โรงพยาบาลสงขลานัครินทร์ ผลการตรวจแสดงในตารางที่ 5 ผลการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานสามารถแยกออกได้เป็นกลุ่มย่อยดังนี้

1.1. ให้ผลตรวจปรกติ จำนวน 112 ราย

1.2. ให้ผลผิดปรกติ จำนวน 188 ราย ซึ่งแบ่งออกเป็น

1.2.1 เป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมีย จำนวน 36 ราย

1.2.2 เป็นบีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์ จำนาน 9 ราย

1.2.3 เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี จำนวน 35 ราย

1.2.4 เป็นฮีโมโกลบินอีโฮโมไซโกต จำนวน 9 ราย

1.2.5 เป็นบีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี จำนวน 23 ราย

1.2.6 เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย จำนวน 55 ราย

1.2.7 เป็นโรคฮีโมโกลบินเฮช จำนวน 21 ราย

รายละเอียดผลการตรวจในแต่ละรายดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 *แสดงผลการตรวจทางโลหิตวิทยาและผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของตัวอย่าง จำนวน 300 ราย ให้ผลตรวจปรกติ จำนวน 112 ราย และผิดปรกติ 188 ราย*

ผลตรวจพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	%A2	OF	DCIP	Inclusn	Mutation	Diagnosis
2007	F	24	12	38	65	23.7	AA2	3	25	0	+	SEA / N	Alpha trait
2016	M	26	13.5	35	63	19.7	AA2	2.5	66	0	-	SEA / N	Alpha trait
2020	F	25	9.9	31	75	24.1	AA2	2.7	51	0	+	SEA / N	Alpha trait
2049	F	27	9.6	30	73	23.6	AA2	1.8	48	0	+	SEA / N	Alpha trait
2157	M	35	13.5	44	67	20.5	AA2	2.8	40	0	-	SEA / N	Alpha trait
2224	M	28	11	24	75	24.7	AA2	2.9	79	0	+	SEA / N	Alpha trait
2232	F	30	11.3	37	63	19.5	AA2	2.9	11	0	+	SEA / N	Alpha trait
2237	M	11	10.7	33	75	24.3	AA2	2.3	75	0	+	SEA / N	Alpha trait
2293	F	31	11.2	31	76	27.7	AA2	3	69	0	-	SEA / N	Alpha trait
2302	F	60	8.3	29	64	18.4	AA2	2.1	71	0	+	ND / ND	Alpha trait
2303	F	11	10	31	67	21.6	AA2	2.1	40	0	+	SEA / N	Alpha trait
2304	F	24	12	38	65	20.6	AA2	3	25	0	ND	SEA / N	Alpha trait
2358	M	5	11.4	35	77	24.8	AA2	2.8	80	0	+	SEA / N	Alpha trait
2360	F	53	8.3	25	69	22.6	AA2	2	72	0	ND	ND / ND	Alpha trait
2362	F	66	4.1	12	72	25.6	AA2	2.3	75	0	+	SEA / N	Alpha trait
2368	M	46	6.2	20	76	23.6	AA2	3.2	82	0	+	? / N	Alpha trait
2372	M	7	7.7	24	55	17.3	AA2	2.9	23	0	+	SEA / N	Alpha trait

ตารางที่ 5 (ต่อ) *ผลตรวจพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย*

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	%A2	OF	DCIP	Inclusn	Mutation	Diagnosis
2373	M	26	13.5	44	66	20.1	AA2	2.7	39	0	-	SEA / N	Alpha trait
2375	M	12	5.9	21	50	13.8	AA2	2.2	52	0	+	SEA / N	Alpha trait
2428	M	1	7.8	25	72	22.6	AA2	2.5	50	0	ND	ND / ND	Alpha trait
2429	F	31	12	37	75	24.4	AA2	2.2	80	0	+	SEA / N	Alpha trait
2431	M	12	6.6	18	60	22.2	AA2	2.3	60	0	+	SEA / N	Alpha trait
2441	M	19	11.6	37	69	21.4	AA2	2.8	70	0	+	ND / N	Alpha trait
2449	F	52	6.1	20	70	21.7	AA2	2.9	75	0	-	SEA / N	Alpha trait
2456	F	23	12.8	35	77	28.1	AA2	2.6	67	0	+	ND / ND	Alpha trait
2473	F	60	9	28	57	18.3	AA2	2.1	80	0	+	SEA / N	Alpha trait
2483	M	58	5.2	16	64	20.4	AA2	1.9	22	0	-	SEA / N	Alpha trait
2502	M	1	8.3	26	60	19.2	AA2	2.2	55	0	-	SEA / N	Alpha trait
2504	M	5	8.3	26	60	19.2	AA2	2.2	45	0	ND	SEA / N	Alpha trait
2507	F	9	8.1	27	45	13.8	AA2	1.2	42	0	ND	ND / ND	Alpha trait
2511	M	36	4	13	59	18.8	AA2	2.8	75	0	+	SEA / N	Alpha trait
2512	M	3	9.3	30	58	18.5	AA2	2.5	65	0	+	SEA / N	Alpha trait
2515	M	76	5.8	19	72	22.1	AA2	2.6	75	0	+	SEA / N	Alpha trait
2524	M	9	4.2	15	54	14.9	AA2	1.6	42	0	+	SEA / N	Alpha trait
2528	F	39	5.8	19	50	15.4	AA2	3.5	65	0	+	SEA / N	Alpha trait
2554	F	27	10.8	33	76	24.8	AA2	2	79	0	+	SEA / N	Alpha trait
2559	F	28	10.3	34	68	20.2	AA2	2.5	50	1	+	SEA / N	Alpha trait
2561	F	19	9.7	31	62	19.4	AA2	2.8	75	0	ND	ND / ND	Alpha trait
2564	F	32	7.9	26	65	19.3	AA2	2.8	62	0	ND	ND / ND	Alpha trait
2573	F	63	8	28	55	16	AA2	1.8	70	0	-	SEA / N	Alpha trait
2582	M	6	10.1	31	64	20.6	AA2	2.9	65	1	ND	ND / ND	Alpha trait
2583	F	63	7.7	24	61	19.4	AA2	2.7	54	0	+	SEA / N	Alpha trait
2584	M	35	4.7	16	57	17.1	AA2	1.9	50	0	+	SEA / N	Alpha trait
2590	M	29	4.7	16	57	17.1	AA2	1.9	45	0	-	SEA / N	Alpha trait
2591	F	28	11.4	35	66	21.3	AA2	2.8	45	0	+	SEA / N	Alpha trait
2597	M	10	3.7	12	77	24.8	AA2	2.6	80	0	+	? / N	Alpha trait
2598	M	28	7.1	23	56	17.6	AA2	1.8	72	0	-	SEA / N	Alpha trait
2601	M	32	14	45	76	24.7	AA2	2.4	82	0	+	? / N	Alpha trait
2624	F	17	10.6	35	71	21.5	AA2	2.68	75	0	+	SEA / N	Alpha trait
2409	F	9	5.7	18	71	21.9	AA2	3	72	0	+	SEA / N	Alpha trait
2418	M	28	8.8	27	76	26.2	AA2	2.6	78	0	ND	ND / ND	Alpha trait
2422	F	35	10	31	66	21.1	AA2	1.6	50	0	ND	ND / ND	Alpha trait
2377	M	36	6.6	20	53	17.3	AA2	2	58	0	-	SEA / N	Alpha trait
2379	F	3	7.3	24	48	14.5	AA2	1.8	58	0	+	SEA / N	Alpha trait
2399	F	28	9.9	31	61	19.4	AA2	2.6	42	0	+	SEA / N	Alpha trait

ตารางที่ 5 *(ต่อ)* *ผลตรวจบีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี*

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	%A2	%F	OF	DCIP	Mutation	Diagnosis
1985	F	26	9.4	30	65	20.6	AA2	5.5		27	0	I 1#5 / N	Beta trait
1987	F	17	10.3	33	58	18.1	AA2	5.4		49	0	cod 17 / N	Beta trait
2033	F	32	9.2	26	47	16.6	AA2	7.7		75	0	cod 17 / N	Beta trait
2037	F	21	11.8	38	65	20.3	AA2	5.1		72	0	cod 17 / N	Beta trait
2118	F	26	9.2	28	68	22.6	AFA2	3.9		31	0	cod 19 / N	Beta trait
2129	F	36	10	33	67	20.7	AA2	4.8		34	0	4 bp / N	Beta trait
2168	M	33	7.6	23	68	22.9	AA2	6.2		40	0	3.5 kb / N	Beta trait
2201	M	26	12.1	38	77	24.6	AA2	5.7		60	0	-28 / N	Beta trait
2203	F	21	11.2	35	66	21	AA2	6.1		62	0	-28 / N	Beta trait
2206	F	9	11.4	36	67	21.2	AA2	5.7		60	0	-28 / N	Beta trait
2212	F	27	9.1	27	65	21.9	AA2	5.2		18	0	4bp / N	Beta trait
2233	F	24	8.7	28	55	17.1	AA2	5.7		46	0	cod 17 / N	Beta trait
2284	M	26	10.8	35	66	20.1	AA2	5.5		72	0	I 2#654 / N	Beta trait
2315	M	35	12.9	40	71	22.6	AA2	6.1		50	1	4 bp / N	Beta trait
2321	F	19	9.2	29	63	20	AA2	5.8		50	0	cod 19 / N	Beta trait
2332	M	59	4.5	18	87	26.6	AA2	4.7		80	0	cod 19 / N	Beta trait
2334	F	30	10.7	32	69	22.9	AA2	4.3		63	0	I 1#5 / N	Beta trait
2359	M	30	11.8	38	62	19.2	AA2	6		59	0	4 bp / N	Beta trait
2376	F	25	11.5	37	67	20.8	AA2	4.8		62	0	I 1#5 / N	Beta trait
2466	M	33	12.5	39	57	18.2	AA2	5.2		62	0	I 1#5 / N	Beta trait
2477	F	31	11.9	35	69	23.2	AA2	5.3		45	0	I 1#1 / N	Beta trait
2481	F	35	10.9	34	60	19.1	AA2	4.2		30	0	4 bp / N	Beta trait
2500	M	28	12.6	40	66	21.1	AA2	6.2		55	0	3.5 kb / N	Beta trait
2508	F	28	9.2	28	60	19.3	AA2	4.5		55	0	I 1#5 / N	Beta trait
2509	M	30	11.4	35	63	19.9	AA2	5.7		55	0	4 bp / N	Beta trait
2510	F	1	7.9	21	82	30.7	AFA2	5.6		84	0	3.5 kb / N	Beta trait
2514	F	30	10.7	32	64	21.6	AA2	5.6		76	0	-28 / N	Beta trait
2529	F	65	5.8	18	59	19.4	AA2	3.7		65	0	I 1#5 / N	Beta trait
2535	F	29	9	29	72	22.4	AA2	5.1		75	0	3.5 kb / N	Beta trait
2555	M	91	6.3	20	72	21.1	AA2	4.6		70	0	4 bp / N	Beta trait
2560	M	34	9.6	33	73	21.3	AA2	5.3		75	0	cod 19 / N	Beta trait
2577	F	19	9.2	31	66	19.5	AA2	5		55	0	cod 19 / N	Beta trait
2593	F	28	11	34	69	22.4	AA2	3.8		69	0	cod 19 / N	Beta trait
2595	F	32	10.6	33	63	19.9	AA2	5.4		46	0	4 bp / N	Beta trait
2596	M	32	13.4	41	60	19.9	AA2	4.9		55	0	4 bp / N	Beta trait
2600	F	31	7.2	22	75	24.7	AA2	4.3		65	0	4 bp / N	Beta trait
1980	M	7	6.5	18	56	19.8	FE	41.5		54	1	3.5 kb / HbE	Beta/HbE
1993	M	23	9.1	29	71	22.4	AFE	18		45	1	-28 / HbE	Beta/HbE
2041	M	31	9	28	69	21.7	AFE	50.7		45	1	-28 / HbE	Beta/HbE
2135	F	4	7.8	24	60	19.6	FE	46.6		22	1	2#654 / HbI	Beta/HbE
2137	F	29	8.3	26	72	23.3	FE	46.4		34	2	4bp / HbE	Beta/HbE
2138	F	14	7.7	23	61	20.2	FE	43.1		42	1	2#654 / HbI	Beta/HbE
2171	F	11	6.2	21	59	20.9	FE	34.9		20	1	I 1#1 / HbE	Beta/HbE
2172	M	6	3.6	13	60	17	FE	61.1		18	2	4 bp / HbE	Beta/HbE

ตารางที่ 5 *(ต่อ)* *ผลตรวจบีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี*

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	%A2	%F	OF	DCIP	Mutation	Diagnosis
2180	F	32	9.3	27	71	24.4	FE	44.4		31	1	3.5 kb / HbE	Beta/HbE
2183	F	5	1.6	6	69	19.5	FE	43.8		12	0	4 bp / HbE	Beta/HbE
2195	M	4	8.3	25	54	18.3	FE	52.8		12	2	4bp / HbE	Beta/HbE
2275	M	24	13.5	42	76	24.5	FE	30.9		18	1	4bp / HbE	Beta/HbE
2344	F	10	6.1	18	67	22.6	FE	49.8		72	3	4bp / HbE	Beta/HbE
2355	M	26	6	17	41	14.3	FEB	24	8.6	42	3	3.5 kb / HbE	Beta/HbE
2367	M	16	5.6	16	60	20.5	FE	51.3		23	2	cod 17/HbE	Beta/HbE
2407	F	19	4.2	13	55	17.8	FE	65.7		20	2	4 bp / HbE	Beta/HbE
2479	F	4	6	18	62	20.4	AFE	27.5	20.4	45	1	cod 19/HbE	Beta/HbE
2492	M	42	5.8	16	52	18.4	FE	50.6		23	2	4 bp / HbE	Beta/HbE
2499	F	11	8	26	70	21.8	AFE	35	17.1	66	1	I 1#5 / HbE	Beta/HbE
2519	F	50	7.7	22	58	20	AFE	65.3	9.9	23	2	-28 / HbE	Beta/HbE
2540	F	2					FE	43.2		23	1	I 1#1 / HbE	Beta/HbE
2563	M	14	7.3	23	66	20.4	FE	42.2		25	1	I 1#1 / HbE	Beta/HbE
2710	M	9			62		FE			36	4	I 1#5 / HbE	Beta/HbE
1986	F	19	11.5	36	68	28.3	AE	27		69	1		HbE trait
1991	F	25	11.6	36	71	22.7	AE	22.4		85	1		HbE trait
1992	M	13	11	32	81	27.3	AE	25.2		86	1		HbE trait
2004	F	39	12	37	77	25.2	AE	33.6		82	1		HbE trait
2014	F	34	12.1	37	78	25.7	AE	37.1		85	2		HbE trait
2038	M	23	12.8	41	82	25.6	AE	33.2		79	1		HbE trait
2044	F	20	12.2	38	85	27.1	AE	31.2		72	1		HbE trait
2046	F	34	11.5	36	69	21.8	AE	18.9		45	1		HbE trait
2054	M	30	13.2	41	80	25.7	AE	35.9		86	2		HbE trait
2119	F	27	12.8	41	81	25	AE	30.1		39	1		HbE trait
2116	F	26	11.8	36	85	27.8	AE	31.5		76	1		HbE trait
2122	F	31	11.4	35	81	26.5	AE	28.1		54	1		HbE trait
2132	M	32	13.4	41	83	27.2	AE	29.9		97	1		HbE trait
2175	M	12	2.6	10	55	14.6	AE	22.3		76	1		HbE trait
2196	M	31	14.1	43	79	25.9	AE	33.2		90	1		HbE trait
2202	F	29	12	36	77	25.3	AE	31.2		85	2		HbE trait
2207	F	7	12.5	39	76	24.6	AE	31.3		85	2		HbE trait
2214	M	32	12.3	39	82	26	AE	30.4		82	2		HbE trait
2215	F	30	11	35	78	24.9	AE	29.9		37	1		HbE trait
2235	M	2	9.4	31	66	19.9	AE	16.7		85	1		HbE trait
2267	F	27	10.9	33	79	26	AE	31.4		62	1		HbE trait
2271	M	31	13.8	43	83	26.9	AE	30.1		77	2		HbE trait
2272	F	30	10.1	30	82	27.5	AE	30.1		65	2		HbE trait
2277	M	32	13.6	43	83	25.9	AE	29.3		85	1		HbE trait
2279	F	27	11	34	80	26.3	AE	32.4		69	1		HbE trait
2290	F	32	11.4	37	73	22.5	AE	25.7		86	1		HbE trait
2297	F	11	5.2	20	65	16.9	AE	28.3		12	1		HbE trait
2314	F	32	11.8	35	72	24.1	AE	30.7		75	1		HbE trait
2316	M	10	7.8	26	56	17	AEB	14.2		45	1		HbE trait

ตารางที่ 5 *(ต่อ)* *ผลตรวจบีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี*

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	%A2	%F	OF	DCIP	Mutation	Diagnosis
2317	M	22	10.1	28	79	28.4	AE	34.2		85	1		HbE trait
2587	F	30	12.3	39	78	24.6	AE	32.3		97	1		HbE trait
2592	F	26	12.6	38	82	27.2	AE	30.5		79	1		HbE trait
2612	M	35	14	43	75	24.3	AE	30.4		83	1		HbE trait
2617	M	24	13.7	42	80	26.1	AE	31.6		80	1		HbE trait
2623	M	25	14.1	42	75	25	AE	31.8		100	1		HbE trait
2043	F	29	10.6	32	61	20.5	EE	100		45	2		Homo E
2134	M	12	9.2	28	57	18.4	EE	100		37	3		Homo E
2338	F	35	9.8	30	67	21.6	EE	100		22	3		Homo E
2341	F	18	11	34	64	20.6	EE	100		50	3		Homo E
2421	F	42	9.6	28	58	19.5	EE	100		22	2		Homo E
2423	M	84	9	27	67	22.6	EE	100		25	3		Homo E
2432	F	37	9	27	61	20.3	EE	100		50	3		Homo E
2486	F	7	8.2	24	51	17.2	EE	100		25	3		Homo E
2589	F	27	8.2	27	66		EE	100		22	3		Homo E
2740	F	12			66		AFA2	2.3	11.54	23	0	4 bp/cod 19	Major
7999	F	11	13.5	41	67		AFA2	1.7	13.4	48	0	cod19/I 1#5	Major
8050	M	12	14	42	79		AFA2	2.02		68	0	-28 / 4 bp	Major
8338	F	9	11.3	34	70		AFA2	3.2	13.5	45	0	4 b /cod19	Major
8900	F	7	8.8	27	78		FA2	2		41	0	4 bp / 4 bp	Major
9367	F	26	12.1	36	72	24.1	AFA2	3	15.9	60	0	cod19/I 1#5	Major
9686	F	32	7.3	28	71	18.8	AFA2	4.4		9	0	cod19/I 1#1	Major
1764	M	11	2	6	67	21.3	AFA2	2.4	32	29	0	cod1 /I 1#5	Major
2494	F	3	7.3	25	62	18	FA2	3.2		22	0	4 bp/I 2#654	Major

ตารางที่ 5 *(ต่อ)* *ผลตรวจโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช*

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	%A2	%H	OF	DCIP	Inclusn	Diagnosis
2002	M	5	8.9	28	48	15.1	HAA2	3.3	4.1	35	1	+	HbH
2040	F	18	9.2	29	76	23.7	HAA2	4.3	3	65	0	+	HbH
2152	F	29	8.1	27	64	18.8	HAA2	1.9	13.6	32	2	+	HbH
2205	M	10	6.1	22	58	16.3	HBAA2	1.3	10.6	12	1	ND	HbH
2298	M	26	9.6	42	65	19.3	HAA2	1	7.7	25	2	+	HbH
2319	F	21	8.1	31	67	19.3	HAA2	0.2	14.9	67	3	+	HbH
2337	M	32	9.4	34	74	20.3	HBAA2	0.8	13.7	45	3	ND	HbH
2342	F	29	9.7	31	59	18.2	HAA2	2.5	3.5	48	2	+	HbH
2351	M	36	9.3	29	79	25.6	HAA2	1.6	9.2	62	2	+	HbH
2394	F	25	9.4	29	63	20.5	HBAA2	1.4	4.9	24	1	+	HbH
2397	M	55	4.6	16	74	21.9	HAA2	2.6	2.7	74	1	+	HbH
2398	M	54	6.8	24	78	22	HAA2	1.3	13	78	2	-	HbH
2401	M	32	8.1	26	53	16.9	HAA2	1.3	3	21	1	ND	HbH
2443	F	26	8.4	29	52	15.2	HBAA2	1.6	2.5	84	0	+	HbH
2444	F	9	8.4	29	52	15.2	HBAA2	1.6	2.5	75	1	+	HbH
2476	F	21	8.5	27	56	17.5	HBAA2	1.1	4.3	52	1	+	HbH
2536	F	19	7.3	25	68	19.5	HBAA2	1.2	17.1	52	2	+	HbH
2541	F	30	6.6	23	76	21.3	HAA2	1	11.9	50	2	+	HbH
2568	M	11	6.3	24	64	16.8	HAA2	0.8	21.6	25	4	+	HbH
2569	M	19	6.3	21	72	20.8	HAA2	7	5.3	30	1	+	HbH
2581	F	5	8	25	49	15.3	HAA2	1.3	2	50	0	+	HbH

ตารางที่ 5 *(ต่อ)* *ผลตรวจในรายปรกติ*

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	% A2	OF	DCIP	Diagnosis
1903	F	27	12.3	37	92	30.4	AA2	2.8	95	0	Normal
1904	F	34	11.4	35	96	31.9	AA2	2.8	97	0	Normal
1906	F	29	11.5	35	87	28.5	AA2	2.4	100	0	Normal
1908	F	21	10.3	33	88	27.3	AA2	2.6	69	0	Normal
1909	F	34	13.5	43	92	28.9	AA2	2.7	86	0	Normal
1975	F	21	10.9	35	85	26.7	AA2	2.4	79	0	Normal
1976	F	33	13.6	42	80	25.8	AA2	2.9	95	0	Normal
1977	F	26	11.5	34	86	29.2	AA2	2.2	86	0	Normal
1984	M	41	15.2	47	89	28.6	AA2	3.2	87	0	Normal
1989	M	28	11.9	36	92	30.5	AA2	2.5	99	0	Normal
1990	F	30	13.9	41	89	30	AA2	2.4	97	0	Normal
1999	F	30	12.7	38	90	30.2	AA2	2.4	97	0	Normal
2000	F	22	11.9	35	91	30.6	AA2	2.5	98	0	Normal
2001	F	30	13.6	42	86	27.5	AA2	2.3	97	0	Normal
2003	F	22	12.6	40	83	25.9	AA2	2.9	81	0	Normal
2005	F	24	9.8	31	86	27.5	AA2	3	96	0	Normal
2006	M	38	15	46	77	25	AA2	1.8	93	0	Normal
2008	F	65	13.4	40	96	31.5	AA2	2.7	91	0	Normal
2015	F	27	14.2	42	86	28.8	AA2	3	93	0	Normal
2017	M	26	13.7	43	91	29	AA2	2.4	95	0	Normal
2021	F	33	13.9	43	92	29.3	AA2	2.6	94	0	Normal
2045	M	26	15.1	46	94	30.8	AA2	1.9	95	0	Normal
2047	M	26	14.2	42	91	30.8	AA2	3.4	93	0	Normal
2048	F	34	12.6	38	93	31.2	AA2	2.8	84	0	Normal
2053	F	29	12.2	38	94	30.5	AA2	2.4	88	0	Normal
2055	F	34	11.2	34	88	28.6	AA2	2.4	100	0	Normal
2117	F	36	12.6	40	94	29.9	AA2	2.7	91	0	Normal
2114	F	29	13.9	43	95	30.6	AA2	3.2	89	0	Normal
2115	M	29	14.5	45	95	30.4	AA2	2.9	92	0	Normal
2120	F	26	11.4	35	103	34	AA2	2.3	89	0	Normal
2121	F	25	12	37	95	30.6	AA2	2	94	0	Normal
2125	M	28	13.4	42	81	25.9	AA2	3	95	1	Normal
2126	M	26	14.4	46	88	27.7	AA2	2.4	95	0	Normal
2127	F	32	12.2	37	88	29.2	AA2	3.2	92	0	Normal
2128	F	22	10.8	34	86	27.3	AA2	3.2	91	0	Normal
2130	F	32	11.1	34	95	31	AA2	2.1	83	0	Normal
2133	M	21	12.4	38	92	30.5	AA2	3.16	97	0	Normal
2140	M	28	16.9	51	93	30.7	AA2	2.8	98	0	Normal
2141	M	27	15.8	49	92	30	AA2	3.2	97	0	Normal
2144	M	64	15	46	90	29.4	AA2	2.7	98	0	Normal
2145	F	32	12.4	37	92	30.5	AA2	3.1	98	0	Normal

ตารางที่ 5 *(ต่อ)* *ผลตรวจในรายปรกติ*

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	% A2	OF	DCIP	Diagnosis
2146	M	18	10	32	85	26.9	AA2	3.1	96	0	Normal
2147	F	32	12.2	36	95	32.1	AA2	2.8	95	1	Normal
2151	F	40	10.1	32	75	23.3	AA2	2	65	0	Normal
2153	F	34	14.6	40	90	33.7	AA2	2.5	85	0	Normal
2155	F	.36	11.5	35	90	29.9	AA2	3.2	87	0	Normal
2158	M	40	13.9	42	86	28.1	AA2	2.8	97	0	Normal
2159	F	37	12.4	37	86	28.9	AA2	2.5	97	0	Normal
2160	F	38	12.5	38	91	30.1	AA2	2.9	91	0	Normal
2161	F	31	11.8	32	83	30.9	AA2	3.2	88	0	Normal
2162	F	34	11.5	35	92	29.9	AA2	2.8	95	0	Normal
2163	F	30	10.9	33	84	27.9	AA2	2.8	88	0	Normal
2164	F	23	10.9	33	87	28.6	AA2	2	73	0	Normal
2165	M	32	14.9	45	81	26.6	AA2	3.2	100	0	Normal
2173	F	29	11.8	36	88	28.7	AA2	2.3	95	0	Normal
2174	F	33	12.1	37	94	31	AA2	2.5	96	0	Normal
2179	F	35	12.4	38	89	29.1	AA2	2.7	91	0	Normal
2181	F	24	10.9	33	82	27.3	AA2	2.9	64	0	Normal
2189	F	24	12.4	39	93	29.4	AA2	2.9	100	0	Normal
2190	F	19	12.3	37	97	32.4	AA2	2.3	100	0	Normal
2191	F	35	13.4	41	88	29.1	AA2	2.9	87	0	Normal
2192	F	29	11.3	35	90	28.9	AA2	2.4	87	0	Normal
2193	F	32	12	35	95	32.8	AA2	2.4	89	0	Normal
2197	F	26	11.3	34	89	29.9	AA2	2.2	87	0	Normal
2198	F	22	11.6	35	90	29.6	AA2	2.6	94	0	Normal
2199	F	27	10.9	34	81	25.7	AA2	2.2	95	0	Normal
2200	F	37	11.9	36	79	27.2	AA2	2.4	94	0	Normal
2208	F	28	11.5	35	87	28.4	AA2	2.2	89	0	Normal
2213	F	32	12.7	40	91	29	AA2	3	100	0	Normal
2216	M	31	14.3	45	95	29.6	AA2	2.5	93	0	Normal
2217	F	25	12	35	88	30.2	AA2	2.7	76	0	Normal
2223	F	23	10.7	31	104	36.1	AA2	2.1	87	0	Normal
2228	M	27	13.2	41	92	29.5	AA2	2.7	72	0	Normal
2229	F	28	13.1	39	90	30.1	AA2	2.5	91	0	Normal
2230	F	30	11.4	34	91	30.4	AA2	2.6	94	0	Normal
2236	F	25	11.1	33	87	29.6	AA2	3.3	98	0	Normal
2238	F	27	11.5	35	92	30.1	AA2	3.1	98	0	Normal
2239	F	32	12.8	39	88	23.8	AA2	2.6	95	0	Normal
2240	F	25	13	38	90	30.5	AA2	2.5	97	0	Normal
2241	M	26	14.2	44	100	32	AA2	2.8	88	0	Normal
2245	F	33	10.9	32	90	30.4	AA2	2.2	100	0	Normal
2243	M	42	12.9	39	88	28.8	AA2	2.4	88	0	Normal

ตารางที่ 5 *(ต่อ)* *ผลตรวจในรายปรกติ*

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	% A2	OF	DCIP	Diagnosis
2244	F	26	13	40	88	28.2	AA2	2.8	91	0	Normal
2248	F	32	12.1	37	93	30.8	AA2	2.3	92	0	Normal
2249	M	31	14.7	46	90	28.4	AA2	2.8	90	0	Normal
2250	F	28	1.4	37	96	31.9	AA2	2.8	98	0	Normal
2255	F	29	11.8	37	83	26.5	AA2	2.4	90	0	Normal
2258	F	25	10.4	31	94	31.5	AA2	2.9	88	0	Normal
2261	F	28	12.4	39	90	28.4	AA2	2.8	100	0	Normal
2260	F	30	12.6	39	91	28.4	AA2	2.8	94	0	Normal
2262	F	30	12	36	90	29.6	AA2	2.7	88	0	Normal
2265	F	37	13	40	87	28.6	AA2	3.2	100	0	Normal
2268	F	26	12.6	39	92	29.7	AA2	3.1	97	0	Normal
2269	F	27	12.6	38	92	30.3	AA2	3	84	0	Normal
2270	F	30	12.6	40	92	29	AA2	3.2	94	0	Normal
2273	F	30	13	39	89	29.3	AA2	2.7	95	0	Normal
2274	F	29	12.3	38	86	27.8	AA2	3.1	100	0	Normal
2278	M	37	14.4	40	88	31.5	AA2	2.1	63	0	Normal
2280	F	28	12.3	39	85	26.9	AA2	2.6	92	0	Normal
2281	F	33	11.5	35	87	28.1	AA2	2.7	81	0	Normal
2608	F	29	12	36	85	28.7	AA2	2.53	97	0	Normal
2609	M	36	14.9	46	89	29.1	AA2	2.99	100	0	Normal
2610	M	35	15	44	87	28.4	AA2	2.4	95	0	Normal
2613	F	26	12.1	38	82	26.5	AA2	2.52	88	0	Normal
2618	F	24	9.8	29	83	28.7	AA2	3.08	100	0	Normal
2619	M	45	13.5	40	88	29.7	AA2	2.53	100	0	Normal
2620	M	38	14.5	43	89	30.3	AA2	2.87	98	0	Normal
2622	F	26	10.3	30	87	29.7	AA2	2.76	92	0	Normal
2625	F	36	12.1	36	89	30	AA2	2.34	87	0	Normal
2626	M	31	12.7	39	86	28.1	AA2	2.17	100	0	Normal
2627	F	32	12	35	91	31.5	AA2	2.52	92	0	Normal
2628	M	31	15.5	46	84	28.1	AA2	2.15	88	0	Normal

2. ผลการตรวจโดยวิธีตรวจกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปรกติ

2.1 <u>ผลการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง</u>

จากตัวอย่าง 8 กลุ่มทั้งหมด 300 ราย ดังรายละเอียดในตารางที่ 5 ได้นำทดสอบเลือดโดย OF test ผลการทดสอบ และค่าความไว (sensitvity) และความจำเพาะ (specificity) ของการทดสอบ แสดงในตารางที่ 6 ผลการทดสอบจะให้ความไวสูงสุดในทุกกลุ่ม ยกเว้นในกลุ่มพาหะของฮีโมโกลบินอี

ตารางที่ 6 *แสดงค่า sensitvity (sens.) ค่า specificity (spec.) ค่า positive (+ pred.) และ negative (– pred.) predictive values ของการทดสอบ one tube osmotic fragility test ในกลุ่มตัวอย่าง 8 กลุ่มในตารางที่ 5*

Samples	OF test		Total	Sens.	Spec.	+ Pred.	– Pred.
	+ ve	– ve					
Normal	13	99	112				
Alpha-thal trait	55	0	55	100.0	88.4	80.9	100.0
Hb H disease	21	0	21	100.0	88.4	61.8	100.0
Beta-thal trait	36	0	36	100.0	88.4	73.5	100.0
Thal major	9	0	9	100.0	88.4	40.9	100.0
Beta-thal/Hb E	23	0	23	100.0	88.4	63.9	100.0
Hb E trait	21	14	35	60.0	88.4	61.8	48.1
Homo Hb E	9	0	9	100.0	88.4	40.9	100.0
Total	187	113	300				

2.2 <u>ผลการตรวจกรองธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปรกติ ชนิดฮีโมโกลบินอี และฮีโมโกลบินเฮ็ช โดยวิธีตกตะกอนด้วยสี DCIP</u>

จากตัวอย่าง 8 กลุ่ม ทั้งหมด 300 ราย ดังรายละเอียดในตารางที่ 5 ได้นำเลือดมาทดสอบโดย DCIP test ผลการทดสอบ และค่าความไว (sensitvity) และความจำเพาะ (specificity) ของการทดสอบแสดงในตารางที่ 7 ให้ความไวของผลการทดสอบจสูงสุด ในกลุ่มฮีโมโกลบินอีและโรคฮีโมโกลบินเอ็ช

ตารางที่ 7 *แสดงค่า sensitvity (sens.) ค่า specificity (spec.) ค่า positive (+ pred.) และ negative (- pred.) predictive values ของการทดสอบ DCIP test ในกลุ่มตัวอย่าง 8 กลุ่มในตารางที่ 5*

Samples	DCIP test						
	+ ve	- ve	Total	Sens.	Spec.	+ Pred.	- Pred.
Normal	2	110	112				
Alpha-thal trait	3	52	55	5.5	98.2	18.8	20.0
Hb H disease	18	3	21	85.7	98.2	58.1	81.2
Beta-thal trait	1	35	36	2.8	98.2	7.1	27.1
Thal major	0	9	9	0.0	98.2	0.0	59.1
Beta-thal/Hb E	22	1	23	95.7	98.2	62.9	92.9
Hb E trait	35	0	35	100.0	98.2	72.9	100.0
Homo Hb E	9	0	9	100.0	98.2	40.9	100.0
Total	90	210	300				

2.3 ผลการตรวจหาอินคลูชั่นบอดีในเม็ดเลือดแดง เพื่อตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช

จากตัวอย่างพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1และโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช จำนวน 55 และ 21 ราย ตามลำดับ ได้นำมาทดสอบโดยการย้อมหาอินคลูชั่นบอดีในเม็ดเลือดแดง ผลการทดสอบและค่าความไวของการทดสอบในตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มแสดงในตารางที่ 8 ในกลุ่มพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียต้องปั่นเลือดแยกเม็ดแดงชั้นใต้ชั้นเม็ดเลือดขาว เพื่อเพิ่มความไวในการทดสอบ

ตารางที่ 8 *แสดงผลการทดสอบการย้อมอินคลูชั่นบอดีในเม็ดเลือดแดง ของพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียและโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช ซึ่งมีความไวร้อยละ 75.6 และ 94.4 ตามลำดับ*

Samples	Inclusion bodies test				
	+ve	- ve	not done	Total	Sens.
Alpha-thal trait	34	11	10	55	75.6
Hb H disease	17	1	3	21	94.4
Total	51	12	13	76	

3. **ความถี่และชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมีย**

จากผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของพาหะและผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปรกติ โดยวิธี ASO-probes hybridization และ direct DNA sequencing จากจำนวนตัวอย่าง 282 อัลลีล ตรวจพบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 14 ชนิด (ไม่รวม Hb E) ความถี่ของการกลายพันธุ์แต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 *ชนิดการกลายพันธุ์และความถี่ของจีนบีตาธาลัสซีเมีย จากพาหะและผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวนตัวอย่าง 282 อัลลีล*

ชนิดการกลายพันธุ์	จำนวนอัลลีล	ความถี่ (ร้อยละ)
1 Codon 41/42 (TTCTTT->TT)	85	30.1
2 IVS 1#5 (G->C)	53	18.8
3 Codon 19 (AAC-AGC)	43	15.2
4 Codon 17 (AAG->TAG)	32	11.3
5 IVS1#1 (G->T)	17	6.0
6 -28 (A->G)	16	5.7
7 3.5 kb deletion	12	4.3
8 IVS2#654 (C->T)	6	2.1
9 Codon 41 (-C)	4	1.4
10 Codon 8/9 (AGTCT->AGGTCT)	1	0.4
11 105 bp deletion	1	0.4
12 Codon 15 (TGG->TAG)	1	0.4
13 CAP site (A->C)	1	0.4
14 IVS1#1 (G->A)	1	0.4
uncharacterized	9	3.1
จำนวนอัลลีลทั้งหมด	**282**	**100**

4. ผลการตรวจกรองคู่สามีภรรยาที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

จากการเปิดให้บริการแนะนำ (counselling) เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย แก่สตรีที่มาฝากครรภ์ ที่คลินิคฝากครรภ์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยให้บริการตรวจกรองและตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ในสตรี

ที่มีอายุครรภ์ไม่เกิน 16 สัปดาห์ ถ้าให้ผลบวก จะแนะนำให้นำสามีมาตรวจ และถ้าผลตรวจให้ผลผิดปรกติและเป็นคู่เสี่ยงต่อโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 3 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น จะแนะนำให้ตรวจทารกในครรภ์และพิจารณายุติการตั้งครรภ์ถ้าพบว่าทารกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง โครงการดังกล่าวเป็นการทดลองศึกษารูปแบบการป้องกันโรคธาลัสซีเมีย เพื่อพัฒนาไปประยุกต์ใช้ต่อไป โดยจะนำไปทดลองใช้ในโรงพยาบาลประจำจังหวัดพัทลุง ผลการศึกษาได้สรุปในช่วงเวลา 18 เดือน คือ ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538

จำนวนสตรีตั้งครรภ์ทั้งหมด 1390 ราย ให้ผลบวกโดยวิธีตรวจกรอง 378 ราย คิดเป็นร้อยละ 27.2 ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 *แสดงผลการตรวจกรอง (screening test) ในสตรีตั้งครรภ์ ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538 จากหญิงตั้งครรภ์ 1390 ราย ให้ผลบวก 378 ราย คิดเป็นร้อยละ 27.2 ของหญิงตั้งครรภ์ทั้งหมด*

เดือน	จำนวนหญิงฝากครรภ์	จำนวนรายที่ให้ผลบวกกับวิธีตรวจกรอง			รวมจำนวนให้ผลบวก	ให้ผลบวกร้อยละ (%)
		OF	DCIP	OF +DCIP		
พ.ค.	72	13	3	7	23	31.9
มิ.ย.	71	6	4	6	16	22.5
ก.ค.	70	7	0	6	13	18.6
ส.ค.	73	5	3	5	13	17.8
ก.ย.	75	10	2	6	18	24.0
ต.ค.	83	10	2	8	20	24.1
พ.ย.	80	14	2	10	26	32.5
ธ.ค.	77	19	4	7	30	39.0
ม.ค	85	12	3	5	20	23.5
ก.พ.	72	9	1	6	16	22.2
มี.ค.	97	17	1	5	23	23.7
เม.ย.	71	13	2	5	20	28.2
พ.ค.	70	11	2	4	17	24.3
มิ.ย.	86	14	1	8	23	26.7
ก.ค.	66	13	0	5	18	27.3
ส.ค.	76	16	1	11	28	36.8
ก.ย.	73	9	1	7	17	23.3
ต.ค.	93	14	3	20	37	39.8
รวม	1390	212	35	131	378	27.2
ร้อยละ	100.0	15.3	2.5	9.4	27.2	

จาก 378 รายที่ให้ผลบวกโดยวิธีตรวจกรอง ได้ตรวจยืนยันผลโดยวิธีมาตรฐาน ให้ผลบวก 334 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.4 ของรายที่ให้ผลบวกโดยวิธีตรวจกรอง และร้อยละ 24.0 ของสตรีฝากครรภ์ที่ได้

รับบริการทั้งหมด (1390 ราย) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 *แสดงผลการตรวจโดยวิธีมาตรฐานทางโลหิตวิทยา เพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียในหญิงฝากครรภ์ ที่ให้ผลบวกกับวิธีตรวจกรองจากตารางที่ 10 ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538 จำนวน 378 ราย ให้ผลบวก 334 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.4 ของจำนวนรายที่ให้ผลบวกกับการตรวจกรอง หรือให้ผลบวกร้อยละ 24.0 ของหญิงตั้งครรภ์ทั้งหมด โดยแบ่งเป็น*

พาหะบีตาธาลัสซีเมีย ร้อยละ 4.0
โรคบีตาธาลัสซีเมีย ร้อยละ 0.4
โรคบีตาธาลัสซีเมียกับฮีโมโกลบินอี ร้อยละ 0.4
พาหะฮีโมโกลบินอี ร้อยละ 11.2
พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย ร้อยละ 7.8
โรคฮีโมโกลบินเฮ็ช ร้อยละ 0.3

เดือน	จำนวนรายที่ให้ผลบวกกับวิธีมาตรฐาน							ร้อยละต่อผลตรวจกรอง
	Beta trait	Thal major	Beta/HbE	HbE	Alpha-trait	HbH	รวม	
พ.ค.	4	0	0	7	9	0	20	87.0
มิ.ย.	1	1	0	10	3	1	16	100.0
ก.ค.	5	0	1	6	0	1	13	100.0
ส.ค	2	1	1	5	4	0	13	100.0
ก.ย.	1	0	1	8	8	0	18	100.0
ต.ค.	4	0	1	9	6	0	20	100.0
พ.ย.	3	0	0	12	4	1	20	76.9
ธ.ค.	4	0	0	10	9	1	24	80.0
ม.ค.	0	0	1	7	10	0	18	90.0
ก.พ.	1	0	0	7	4	0	12	75.0
มี.ค.	4	1	0	6	9	0	20	87.0
เม.ย.	4	0	0	7	5	0	16	80.0
พ.ค.	3	1	0	6	4	0	14	82.4
มิ.ย.	4	0	0	9	10	0	23	100.0
ก.ค.	3	0	1	5	8	0	17	94.4
ส.ค.	3	0	0	12	8	0	23	82.1
ก.ย.	3	0	0	6	5	0	14	82.4
ต.ค.	7	1	0	23	2	0	33	89.2
รวม	56	5	6	155	108	4	334	88.4
ร้อยละ	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
ต่อหญิงฝากครรภ์ทั้งหมด 1390 ราย	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

จากจำนวนสตรีที่มาฝากครรภ์และให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐานจำนวน 334 ราย ได้แนะนำให้สามีมาตรวจ และได้มาตรวจทั้งหมด 247 ราย คิดเป็นร้อยละ 74 ของภรรยาที่ให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐาน โดยให้ผลผิดปรกติ 71 ราย (ร้อยละ 28.7) และพบคู่เสี่ยงทั้งหมด 27 คู่ คิดเป็นร้อยละ 1.9 ของสตรีที่มาฝากครรภ์ทั้งหมด (1390 ราย) ดังรายละเอียดในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 *แสดงจำนวนสามีและภรรยาที่ให้ผลบวกโดยวิธีตรวจมาตรฐาน และจำนวนคู่เสี่ยงต่อการมีลูกโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538*

เดือน	จำนวนสามีที่มาตรวจ	จำนวนสามีที่ให้ผลบวก	ร้อยละสามีที่ให้ผลบวก	จำนวนภรรยาที่ให้ผลบวก	ร้อยละสามีที่มาตรวจ	จำนวนคู่เสี่ยง	ร้อยละคู่เสี่ยงต่อหญิงฝากครรภ์ทั้งหมด
พ.ค.	13	3	23.1	20	65.0	0	0.0
มิ.ย.	9	1	11.1	16	56.2	0	0.0
ก.ค.	10	4	40.0	13	76.9	3	4.3
ส.ค.	11	3	27.3	13	84.6	2	2.7
ก.ย.	15	6	40.0	18	83.3	2	2.7
ต.ค.	5	2	40.0	20	25.0	2	2.4
พ.ย.	15	5	33.3	20	75.0	2	2.5
ธ.ค.	19	7	36.8	24	79.2	2	2.6
ม.ค.	17	3	17.6	18	94.4	0	0.0
ก.พ.	8	3	37.5	12	66.7	2	2.8
มิ.ค.	19	7	36.8	20	95.0	2	2.1
เม.ย.	14	4	28.6	16	87.5	2	2.8
พ.ค.	12	3	25.0	14	85.7	2	2.9
มิ.ย.	19	2	10.5	23	82.6	1	1.2
ก.ค.	8	0	0.0	17	47.1	0	0.0
ส.ค.	14	5	35.7	23	60.9	0	0.0
ก.ย.	10	2	20.0	14	71.4	0	0.0
ต.ค.	29	11	37.9	33	87.9	5	5.4
รวม	247	71	28.7	334	74.0	27	1.9

5. ผลการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์

ผลการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ทั้งหมด 31 ครอบครัว โดยมี 27 ครอบครัวได้จากการตรวจหาพาหะธาลัสซีเมียตามแผนการควบคุมและป้องกันโรคที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ดังกล่าวข้างต้น และอีก 4 ครอบครัวได้จากครอบครัวที่มีประสพการณ์มีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมีย ผลการตรวจในครรภ์ คือ ปรกติ 6 ราย เป็นพาหะ 15 ราย เป็นโรค 8 ราย และเป็นพาหะหรือปรกติ 2 ราย รายละเอียดผลการตรวจแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 *ผลการตรวจทารกในครรภ์ ในคู่สมรสที่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมีย จำนวน 31 คู่ ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2537 ถึง 31 ตุลาคม 2538 (@ = haplotype analysis)*

Family no.	Genotype		
	Father	Mother	Fetus
1	IVS1#1 / normal	Hb E / normal	**IVS1#1 / Hb E**
2	Hb E / normal	4 bp / normal	Hb E / normal
3	Hb E / normal	IVS1#1 / Hb E	**IVS1#5 / Hb E**
4	4 bp / Hb E	deletion @ / Hb E	Hb E / normal
5	4 bp / normal	unknown / normal	unknown / normal
6	IVS1#1 / normal	IVS1#5 / normal	IVS1#1 / normal
7	IVS1#5 / normal	Hb E / normal	**IVS1#5 / Hb E**
8	4 bp / normal	4 bp / normal	4 bp / normal
9	3.5 kb / Hb E	3.5 kb / normal	**3.5 kb / 3.5 kb**
10	-28/ normal	4 bp / normal	**-28 / 4 bp**
11	Hb E / normal	-28 / normal	**Hb E / -28**
12	Hb E / normal	IVS1#1 / normal	IVS1#1 / normal
13	Hb E / normal	cod 17 / normal	cod 17 / normal
14	IVS1#5 / normal	Hb E / normal	normal / normal
15	Hb E / normal	cod 17 / normal	normal / normal
16	4 bp / normal	Hb E / normal	Hb E / normal
17	IVS2#654 / normal	Hb E / normal	IVS2#654 / normal
18	alpha-thal1 / normal	alpha-thal1 / normal	alpha-thal1 / normal
19	Hb E / normal	4 bp / normal	4 bp / normal
20	Hb E / normal	unknown / normal	unknown / normal
21	cod 19 / normal	IVS1#5 / normal	**cod 19 / IVS1#5**
22	alpha-thal1 / normal	alpha-thal1 / normal	alpha-thal1 / normal
23	IVS1#5 / normal	Hb E / normal	normal / normal
24	Hb E / normal	cod 19 / normal	Hb E / normal
25	Hb H	alpha-thal1 / normal	normal / normal
26	IVS1#1 / normal	Hb E / normal	Hb E / normal
27	alpha-thal1 / normal	alpha-thal1 / normal	**Hb Bart's Hydrop**
28	alpha-thal1 / normal	alpha-thal1 / normal	normal / normal
29	3.5 kb / normal	Hb E / normal	Hb E / normal
30	cod 19 / normal	cod41(-C) / normal	cod 19 / normal
31	Hb E / normal	3.5 kb / normal	normal / normal

6. ผลการพัฒนาวิธีตรวจทางอิมมูโนวิทยา

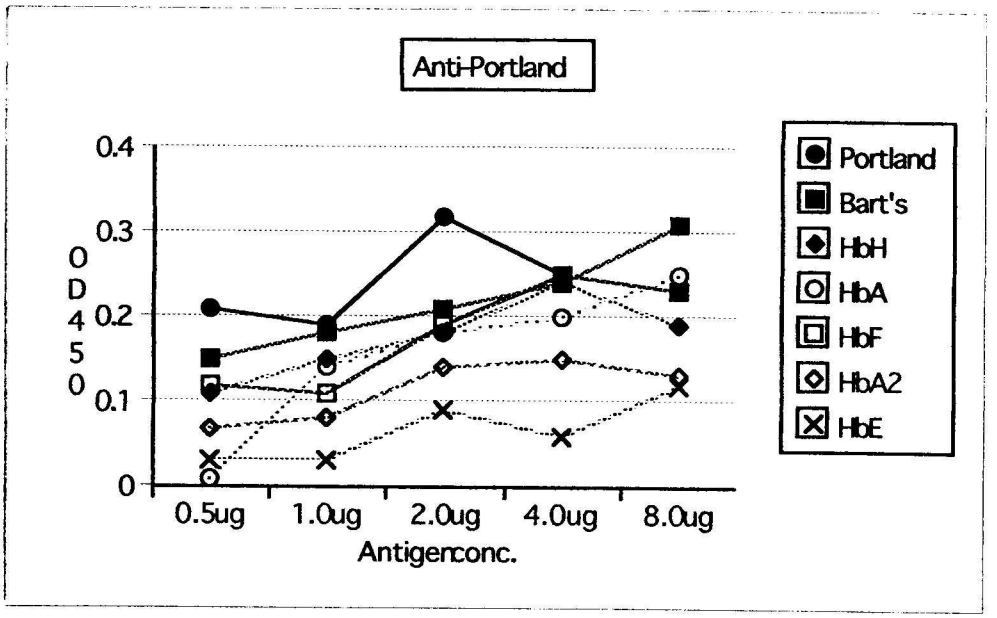
6.1 การเตรียมแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบิน

ฮีโมโกลบินพอร์ทแลนด์ ($\zeta_2\gamma_2$) ฮีโมโกลบินบาร์ทส์ (γ_4) และฮีโมโกลบินเฮ็ช (β_4) เตรียมได้จากฮีโมโกลบินของทารกบวมน้ำชนิดมีฮีโมโกลบินบาร์ทส์ และทำให้บริสุทธิ์โดยกรองผ่าน DEAE-cellulose column chromatography โดยใช้น้ำยา glycine/KCN/NaCl นำแต่ละส่วนที่แยกได้มาฉีดกระตุ้นกระต่าย โดยฉีดกระตุ้นซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง เริ่มต้นด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังด้วยแอนติเจนที่ผสมใน Freund's adjuvant ข้างละ 0.5 มล. และตามด้วยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำหลาย ๆ ครั้งด้วยช่วงเวลาที่เหมาะสม แล้วเก็บรวบรวมซีรั่มซึ่งได้ทดสอบหาระดับของแอนติบอดีโดยวิธี Ouchterlony double diffusion เป็นระยะ นำซีรั่มที่เก็บรวบรวมได้มาแยกแอนติบอดี้และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี adsorption affinity chromatography โดยใช้ cyanogen bromide-activated sepharose 4B coupled with normal cord blood hemolysate แล้วนำมาทดสอบความจำเพาะ (specificity) กับฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ โดยวิธี ELISA ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 14, 15 และ 16

แอนติเจนที่ใช้ทดสอบความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เพื่อพัฒนา ELISA เตรียมได้จาก hemolysate ของผู้ป่วยที่มี hemoglobin type เป็น FE, EE และ AA_2 โดยนำมาแยก ด้วยวิธี macrocolumn chromatography และวัดความเข้มข้นด้วย spectophotometer

ตารางที่ 14 แสดงค่า OD ของ ELISA ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี้ต่อฮีโมโกลบินพอร์ทแลนด์ โดยทดสอบกับฮีโมโกลบินชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแอนติเจน

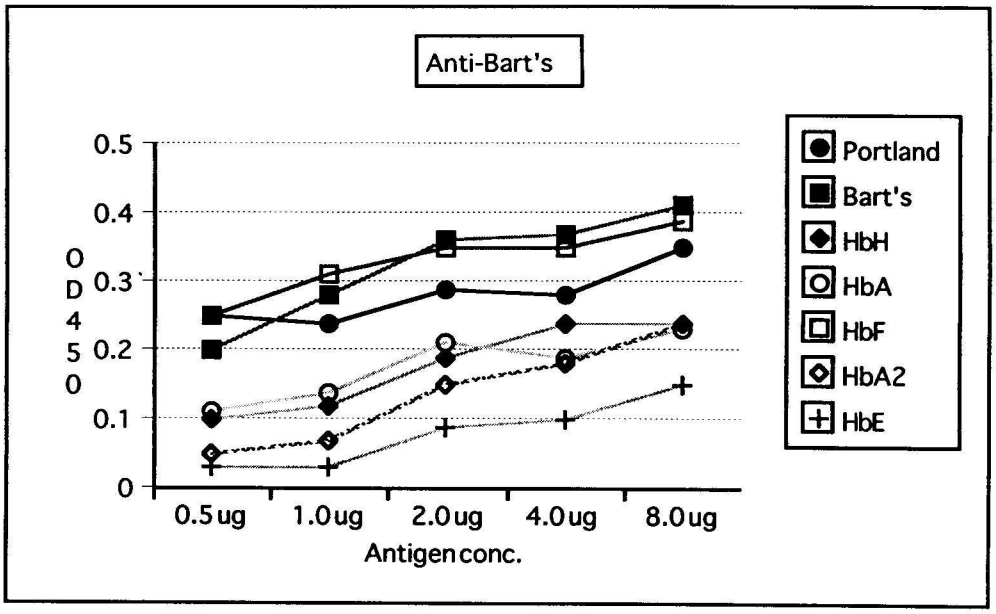
Antibody	Antigen	0.5ug	1.0ug	2.0ug	4.0ug	8.0ug
anti-Portland	Portland	0.21	0.19	0.32	0.25	0.23
	Bart's	0.15	0.18	0.21	0.24	0.31
	HbH	0.11	0.15	0.18	0.24	0.19
	HbA	0.01	0.14	0.18	0.2	0.25
	HbF	0.12	0.11	0.19	0.25	0.23
	HbA2	0.07	0.08	0.14	0.15	0.13
	HbE	0.03	0.03	0.09	0.06	0.12



รูปที่ 13 *เปรียบเทียบค่า OD ของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีฮีโมโกลบินพอร์ทแลนด์*

ตารางที่ 15 *แสดงค่า OD ของ ELISA ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี้ต่อฮีโมโกลบินบาร์ท โดยทดสอบกับฮีโมโกลบินชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแอนติเจน*

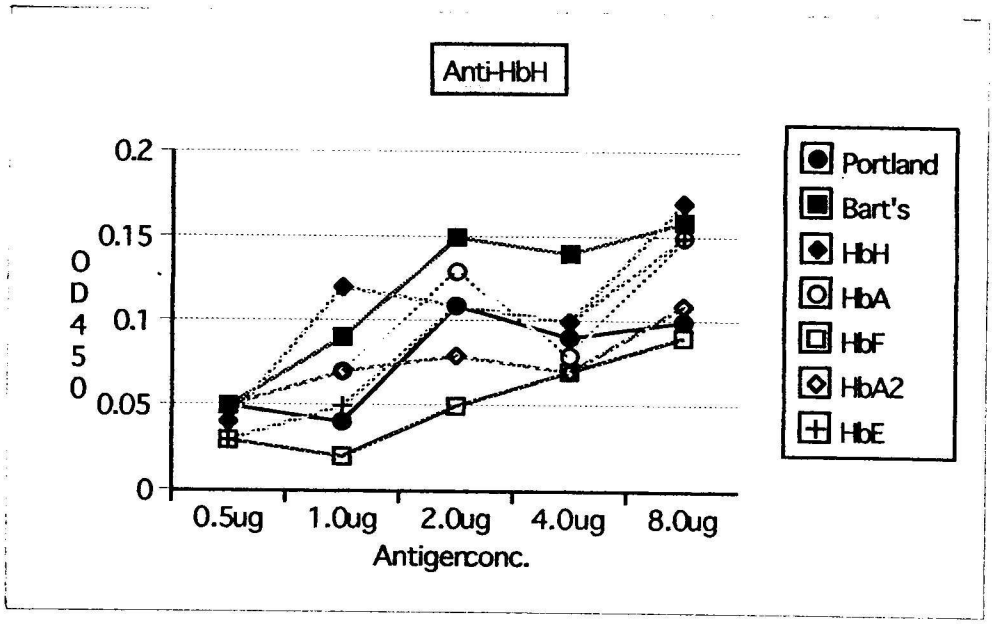
Antibody	Antigen	0.5ug	1.0ug	2.0ug	4.0ug	8.0ug
anti-Bart's	Portland	0.25	0.24	0.29	0.28	0.35
	Bart's	0.2	0.28	0.36	0.37	0.41
	HbH	0.1	0.12	0.19	0.24	0.24
	HbA	0.11	0.14	0.21	0.19	0.23
	HbF	0.25	0.31	0.35	0.35	0.39
	HbA2	0.05	0.07	0.15	0.18	0.24
	HbE	0.03	0.03	0.09	0.1	0.15



รูปที่ 14 *เปรียบเทียบค่า OD ของฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีฮีโมโกลบินบาร์ท*

ตารางที่ 16 *แสดงค่า OD ของ ELISA ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินเฮ็ช โดยทดสอบกับฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆที่ใช้เป็นแอนติเจน*

Antibody	Antigen	0.5ug	1.0ug	2.0ug	4.0ug	8.0ug
anti-HbH	Portland	0.05	0.04	0.11	0.09	0.1
	Bart's	0.05	0.09	0.15	0.14	0.16
	HbH	0.04	0.12	0.11	0.1	0.17
	HbA	0.05	0.07	0.13	0.08	0.15
	HbF	0.03	0.02	0.05	0.07	0.09
	HbA2	0.05	0.07	0.08	0.07	0.11
	HbE	0.03	0.05	0.11	0.1	0.15



รูปที่ 15 *เปรียบเทียบค่า OD ของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีฮีโมโกลบินเฮ็ช*

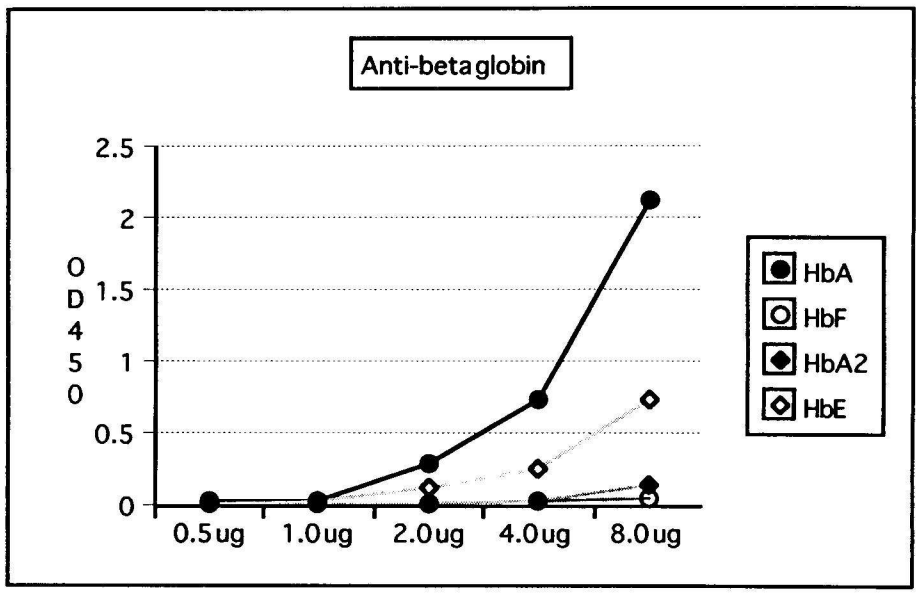
6.2 <u>ผลการทดสอบแอนติบอดีสำเร็จที่มีผลิตทางการค้า</u>

เนื่องจากแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดที่เตรียมได้ มีความจำเพาะและความไวต่ำมาก ไม่สามารถนำไปพัฒนาการทดสอบต่อไปได้ สาเหตุอาจเกิดจากการเตรียมแอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ หรืออาจเป็นเพราะคุณสมบัติของแอนติเจนที่ไม่เสถียรในบางสภาวะ คณะผู้วิจัยไม่สามารถทำการทดลองซ้ำได้ เนื่องจากไม่มีความพร้อมและความชำนาญในการเลี้ยงและดูแลสัตว์ทดลอง จึงได้สั่งซื้อแอนติบอดีสำเร็จที่มีผลิตทางการค้า คือ แอนติบอดีต่อโกลบินแอลฟา (anti-alpha) แอนติบอดีต่อโกลบินบีตา (anti-beta) และแอนติบอดีต่อโกลบินเดลตา (anti-delta)จากบริษัท Imuno-rx ประเทศสหรัฐอเมริกา มาประยุกต์ใช้แทน โดยนำมาทดสอบหาความจำเพาะและความไวต่อฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ และนำมาทดสอบกับน้ำฮีโมโกลบิน ของผู้ป่วยในกลุ่มต่างๆ เพื่อหาสัดส่วนของค่า ELISA ที่แตกต่างกันในกลุ่มผู้ป่วยเหล่านี้ และพัฒนาไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยต่อไป

ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ anti-beta, anti-alpha และ anti-delta ที่ความเข้มข้นต่างๆกันของ Hb A, Hb F, Hb A_2, และ Hb E ผลการทดสอบแสดงในตาราง 17, 18 และ 19

ตารางที่ 17 *เปรียบเทียบค่า OD ของ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำปฏิกิริยากับ anti-beta globin*

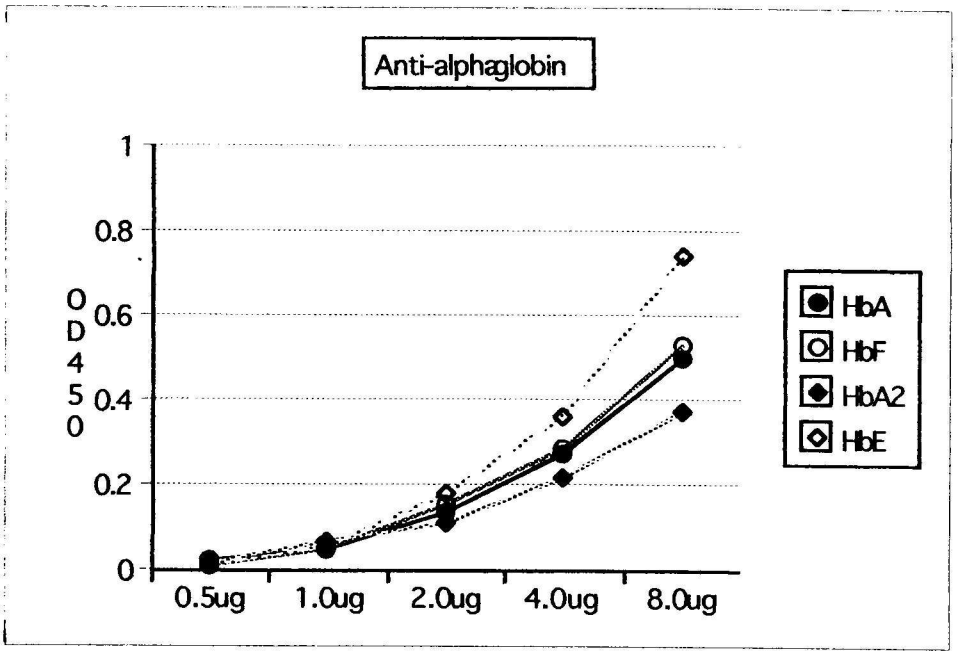
Antibody	Antigen	0.5ug	1.0ug	2.0ug	4.0ug	8.0ug
anti-beta	HbA	0.041	0.043	0.29	0.747	2.138
	HbF	0.01	0.011	0.02	0.033	0.063
	HbA2	0.017	0.018	0.024	0.028	0.149
	HbE	0.013	0.031	0.129	0.266	0.748



รูปที่ 16 *กราฟเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของ anti-beta ต่อ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆ*

ตารางที่ 18 *เปรียบเทียบค่า OD ของ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำปฏิกิริยากับ anti-alpha globin*

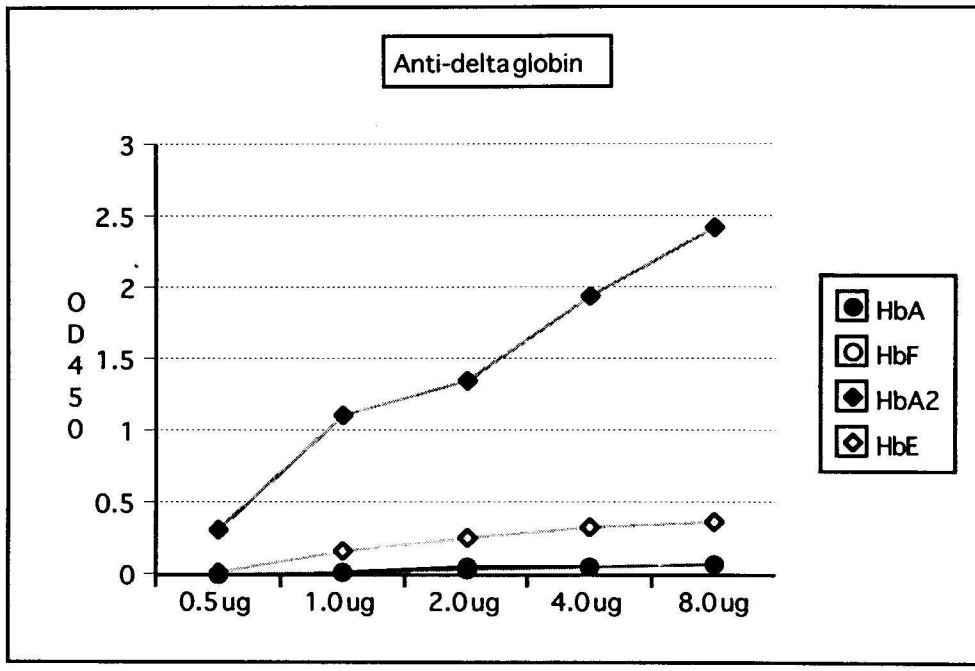
Antibody	Antigen	0.5ug	1.0ug	2.0ug	4.0ug	8.0ug
anti-alpha	HbA	0.022	0.053	0.14	0.276	0.499
	HbF	0.012	0.052	0.159	0.287	0.529
	HbA2	0.018	0.071	0.112	0.219	0.376
	HbE	0.012	0.054	0.181	0.361	0.746



รูปที่ 17 *กราฟเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของ anti-alpha ต่อ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆ*

ตารางที่ 19 *เปรียบเทียบค่า OD ของ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำปฏิกิริยากับ anti-delta globin*

Antibody	Antigen	0.5ug	1.0ug	2.0ug	4.0ug	8.0ug
anti-delta	HbA	0.006	0.021	0.057	0.061	0.078
	HbF	0.004	0.015	0.034	0.06	0.075
	HbA2	0.313	1.102	1.347	1.936	2.43
	HbE	0.023	0.167	0.258	0.325	0.373



รูปที่ 18 *กราฟเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของ anti-delta ต่อ Hb A, Hb F, Hb A_2 และ Hb E ที่ความเข้มข้นต่างๆ*

6.3 <u>การพัฒนา ELISA เพื่อช่วยวินิจฉัยธาลัสซีเมีย</u>

ได้นำวิธี ELISA มาทดสอบกับ hemolysate ของตัวอย่าง 6 กลุ่ม คือ

- กลุ่ม Hb Type ปรกติ 30 ราย
- กลุ่ม Beta thalassemia trait 32 ราย
- กลุ่ม Hb F 4 ราย
- กลุ่ม Hb E trait 8 ราย
- กลุ่ม Hb H 15 ราย และ
- กลุ่ม alpha thalassemia trait 16 ราย

และนำสัดส่วน OD (OD ratio) ของแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบเพื่อหาความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ในแต่ละกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 *เปรียบเทียบค่า OD ของ ELISA ของ anti-beta, anti-alpha และ anti-delta ทำปฏิกิริยากับ hemolysate ของตัวอย่าง 6 กลุ่ม และแสดงค่าสัดส่วนของ OD เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม*

Diagnosis	% Hb A2	OD1 (anti-delta)	OD2 (anti-beta)	OD3 (anti-alpha)	OD1/OD2	OD3/OD2
Normal	2.1	0.333	1.429	0.76	0.2	0.5
Normal	2.8	0.19	1.197	0.83	0.2	0.7
Normal	2.8	0.275	1.364	0.832	0.2	0.6
Normal	2.7	0.275	1.143	0.718	0.2	0.6
Normal	2.1	0.35	1.511	0.903	0.2	0.6
Normal	2.4	0.175	0.773	1.164	0.2	1.5
Normal	2.5	0.333	1.43	0.75	0.2	0.5
Normal	2.1	0.275	1.297	0.73	0.2	0.6
Normal	2.4	0.35	1.564	0.84	0.2	0.5
Normal	2.4	0.19	1.143	0.518	0.2	0.5
Normal	2.3	0.175	1.59	0.603	0.1	0.4
Normal	2.5	0.174	0.773	1.064	0.2	1.4
Normal	2.3	0.195	1.229	0.75	0.2	0.6
Normal	2.6	0.275	1.397	0.83	0.2	0.6
Normal	2.8	0.281	1.464	0.832	0.2	0.6
Normal	3.1	0.205	1.143	0.718	0.2	0.6
Normal	2.7	0.275	1.521	0.403	0.2	0.3
Normal	2.5	0.235	1.573	0.594	0.1	0.4
Normal	2.4	0.244	1.412	0.76	0.2	0.5
Normal	2.7	0.235	1.297	0.73	0.2	0.6
Normal	2.8	0.244	1.364	0.832	0.2	0.6
Normal	2.6	0.205	1.243	0.718	0.2	0.6
Normal	2.5	0.275	1.321	0.792	0.2	0.6
Normal	2.6	0.195	0.773	1.22	0.3	1.6
Normal	2.6	0.203	1.207	0.802	0.2	0.7
Normal	2.7	0.198	1.164	0.718	0.2	0.6
Normal	2.5	0.215	1.243	0.603	0.2	0.5
Normal	2.1	0.212	1.523	0.752	0.1	0.5
Normal	2.7	0.32	1.421	1.064	0.2	0.7
Normal	2	0.294	1.209	0.764	0.2	0.6
				average	0.2	0.7

ตารางที่ 20 *(ต่อ)*

Diagnosis	% Hb A2	OD1 (anti-delta)	OD2 (anti-beta)	OD3 (anti-alpha)	OD1/OD2	OD3/OD2
Beta trait	4.4	0.449	0.846	0.587	0.5	0.7
Beta trait	6.7	0.846	1.495	0.72	0.6	0.5
Beta trait	4.6	0.18	0.351	0.712	0.5	2.0
Beta trait	6.7	0.653	1.114	0.903	0.6	0.8
Beta trait	6 .	0.515	1.058	0.879	0.5	0.8
Beta trait	4.7	0.55	1.009	0.648	0.5	0.6
Beta trait	3.9	0.532	1.04	0.515	0.5	0.5
Beta trait	4.8	0.424	0.974	0.608	0.4	0.6
Beta trait	5.1	0.489	0.913	0.619	0.5	0.7
Beta trait	4.5	0.413	0.942	0.819	0.4	0.9
Beta trait	4.7	0.449	0.866	0.597	0.5	0.7
Beta trait	6.7	0.846	1.495	0.72	0.6	0.5
Beta trait	4.6	0.18	0.351	0.712	0.5	2.0
Beta trait	5.7	0.553	1.214	0.903	0.5	0.7
Beta trait	5.9	0.515	1.058	0.879	0.5	0.8
Beta trait	4.7	0.55	1.009	0.648	0.5	0.6
Beta trait	4.9	0.532	1	0.51	0.5	0.5
Beta trait	4.8	0.424	0.974	0.608	0.4	0.6
Beta trait	4.1	0.589	0.913	0.519	0.6	0.6
Beta trait	4.7	0.403	0.942	0.809	0.4	0.9
Beta trait	4.9	0.549	0.846	0.587	0.6	0.7
Beta trait	6.7	0.846	1.495	0.72	0.6	0.5
Beta trait	4.6	0.18	0.301	0.612	0.6	2.0
Beta trait	5.7	0.653	1.114	0.903	0.6	0.8
Beta trait	6.2	0.515	1.008	0.879	0.5	0.9
Beta trait	4.7	0.57	1.009	0.648	0.6	0.6
Beta trait	3.9	0.532	1.04	0.535	0.5	0.5
Beta trait	4.8	0.424	0.974	0.608	0.4	0.6
Beta trait	5.5	0.499	0.913	0.629	0.5	0.7
Beta trait	5.7	0.423	0.902	0.809	0.5	0.9
Beta trait	5.1	0.489	0.913	0.619	0.5	0.7
Beta trait	4.9	0.453	0.842	0.809	0.5	1.0
				average	**0.5**	**0.8**
AF	0	0.019	0.053	0.249	0.4	4.7
AF	0	0.006	0.058	0.223	0.1	3.8
AFA2	2.4	0.108	0.285	0.155	0.4	1.8
AFA2	1	0.049	0.141	0.14	0.3	1.0
				average	**0.3**	**2.8**

ตารางที่ 20 *(ต่อ)*

Diagnosis	% Hb A2	OD1 (anti-delta)	OD2 (anti-beta)	OD3 (anti-alpha)	OD1/OD2	OD3/OD2
Hb E trait	32.6	0.079	0.349	0.183	0.2	1.9
Hb E trait	14.1	0.102	0.243	0.1	0.4	2.4
Hb E trait	17.6	0.072	0.228	0.082	0.3	2.8
Hb E trait	26.4	0.172	0.979	0.454	0.2	0.5
Hb E trait	10	0.257	0.98	0.949	0.3	1.0
Hb E trait	29.1	0.239	1.173	0.661	0.2	0.6
Hb E trait	29.8	0.244	1.201	0.704	0.2	0.6
Hb E trait	27.2	0.195	1.052	0.624	0.2	0.6
				average	0.2	1.3
HbH		0.029	0.553	0.025	0.1	0.0
HbH		0.044	0.255	0.087	0.2	0.3
HbH		0.042	0.345	0.077	0.1	0.2
HbH		0.18	0.59	0.083	0.3	0.1
HbH		0.075	0.426	0.09	0.2	0.2
HbH		0.028	0.523	0.027	0.1	0.1
HbH		0.033	0.247	0.077	0.1	0.3
HbH		0.042	0.245	0.072	0.2	0.3
HbH		0.08	0.35	0.083	0.2	0.2
HbH		0.175	0.426	0.08	0.4	0.2
HbH		0.023	0.423	0.027	0.1	0.1
HbH		0.043	0.252	0.067	0.2	0.3
HbH		0.042	0.245	0.072	0.2	0.3
HbH		0.11	0.38	0.073	0.3	0.2
HbH		0.181	0.402	0.07	0.5	0.2
				average	0.2	0.2
Alpha trait		0.079	0.375	0.15	0.2	0.4
Alpha trait		0.107	0.287	0.135	0.4	0.5
Alpha trait		0.087	0.43	0.14	0.2	0.3
Alpha trait		0.059	0.385	0.14	0.2	0.4
Alpha trait		0.117	0.387	0.134	0.3	0.3
Alpha trait		0.057	0.53	0.14	0.1	0.3
Alpha trait		0.065	0.387	0.12	0.2	0.3
Alpha trait		0.097	0.287	0.135	0.3	0.5
Alpha trait		0.087	0.54	0.12	0.2	0.2
Alpha trait		0.088	0.385	0.13	0.2	0.3
Alpha trait		0.117	0.367	0.135	0.3	0.4
Alpha trait		0.087	0.534	0.15	0.2	0.3
Alpha trait		0.069	0.372	0.18	0.2	0.5
Alpha trait		0.1	0.299	0.125	0.3	0.4
Alpha trait		0.117	0.288	0.125	0.4	0.4
Alpha trait		0.057	0.43	0.1	0.1	0.2
				average	0.2	0.4

จากผลการทดสอบในตารางที่ 20 สัดส่วนของ anti-delta/anti-beta (OD1/OD2) มีความแตกต่างกันชัดเจน ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปรกติ (range = 0.1-0.3, average = 0..2) และกลุ่มพาหะบีตาธาลัสซีเมีย (range = 0.4-0.6, average = 0.5) ถ้าใช้ค่า 0.2 เป็นค่าพิจารณาความแตกต่าง (cut off value) คือถ้าค่าสัดส่วนมากกว่า 0.2 ให้การวินิจฉัยว่าเป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมีย ให้ผลความไวและความจำเพาะ 100% และสัดส่วนของ anti-alpha/anti-beta (OD3/OD2) มีความแตกต่าง ($P< 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปรกติ (range =0.3-1.6) average = 0.7) และกลุ่มแอลฟาธาลัสซีเมีย คือ กลุ่มฮีโมโกลบินเฮ็ช (range = 0-0.3, average = 0.2) และกลุ่มพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (range = 0.2-0.5, average = 0.4) โดยใช้ค่า 0.6 เป็นค่าพิจารณาความแตกต่าง (cut off value) คือถ้าค่าสัดส่วนน้อยกว่า 0.6 ให้การวินิจฉัยว่าเป็นพาหะจีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 หรือโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช ซึ่งให้ผลความไวและความจำเพาะ 100% เช่นกัน

ข้อวิจารณ์

ประมาณร้อยละ 20-40 ของประชากรในประเทศไทย มีจีนแอลฟาธาลัสซีเมีย และร้อยละ 3-9 มีจีนบีตาธาลัสซีเมีย นอกจากนี้พบจีนของฮีโมโกลบินผิดปรกติอีก 2 ชนิดที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย คือ ฮีโมโกลบินอี ซึ่งมีอุบัติการทั่วประเทศประมาณร้อยละ 13 และฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง ซึ่งมีอุบัติการทั่วประเทศประมาณร้อยละ 1-11 นอกจากนี้ยังพบว่าการกลายพันธุ์ของจีนธาลัสซีเมียมีหลายชนิด และมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่ ในแต่ละกลุ่มประชากร ความรุนแรงของโรคธาลัสซีเมียแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ไม่มีอาการเลยจนถึงเสียชีวิตทั้งหมด เนื่องจากความหลากหลายและความแตกต่างดังกล่าว ทำให้ธาลัสซีเมียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ ทั้งด้านการดูแลรักษาและการตรวจวินิจฉัย โดยเฉพาะการรักษาผู้ป่วย ปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมที่จะรักษาให้หายขาดได้ ส่วนใหญ่เป็นการรักษาตามอาการ โดยการให้เลือดและยาขับเหล็ก ซึ่งต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูงมาก การควบคุมและป้องกันโรคจึงเป็นแนวทางที่สำคัญและดีที่สุด ซึ่งหลายประเทศในแถบเมดิเตอร์เรเนียนได้ทำสำเร็จ แบบแผนการควบคุมและป้องกันโรคในแต่ละกลุ่มประชากรจะไม่เหมือนกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น พื้นฐานการศึกษา จำนวนประชากร รูปแบบการให้บริการสาธารณสุข และความหลากหลายของชนิดธาลัสซีเมียในประชากรนั้นๆ เพราะฉะนั้นการดำเนินการป้องกันและควบคุมโรคทางพันธุกรรมชนิดนี้ให้ได้ผลสำเร็จ ต้องอาศัยองค์ความรู้หลายๆด้าน และการวางแผนที่เหมาะสม ขั้นตอนสำคัญในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย คือ การประชาสัมพันธ์และการแนะนำให้คำปรึกษาเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียอย่างทั่วถึงและถูกต้อง การตรวจวินิจฉัยและค้นหาพาหะได้ทั่วถึงและแม่นยำ และการให้บริการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ได้รวดเร็วตั้งแต่อายุครรภ์น้อยๆ และที่สำคัญคือต้องมีสถานบริการทางการแพทย์ที่สามารถให้บริการยุติการตั้งครรภ์เมื่อตรวจพบว่าทารกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาทางด้านเทคนิค เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสม มาใช้ตรวจวินิจฉัยพาหะของโรคคือพ่อและแม่ และวินิจฉัยทารกในครรภ์ การตรวจวินิจฉัยพาหะแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอนสำคัญคือ ขั้นตอนแรกเป็นการตรวจกรอง (screening test) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการตรวจหาคู่สามีภรรยาที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรค หัวใจสำคัญของวิธีการตรวจกรองคือต้องเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ทำได้ง่าย สามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก ต้นทุนในการตรวจต่ำ สามารถเปิดให้บริการได้ในโรงพยาบาลระดับอำเภอ และที่สำคัญต้องมีความไว (sensitivity) สูง (100%) และขั้นตอนที่สองเป็นขั้นตอนการตรวจยืนยันผลเพื่อวินิจฉัยและแยกชนิดของธาลัสซีเมีย ขั้นตอนนี้ต้องอาศัยความชำนาญและเทคนิคที่ซับซ้อน สามารถปฏิบัติได้ในโรงพยาบาลประจำจังหวัด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ และโรงเรียนแพทย์ วิธีที่ใช้ตรวจต้องมีความจำเพาะและความไวสูง เรียกว่าวิธีมาตรฐาน (standard test) ส่วนการวินิจฉัยทารกในครรภ์เป็นการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจทางด้านตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมและสามารถเปิดให้บริการในการตรวจประจำวันได้ นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาความถี่และชนิดการกลายพันธุ์ของจีนบีตาธาลัสซีเมียในผู้ป่วยที่มารับบริการที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีภูมิลำเนาในหลายจังหวัดในภาคใต้ จึงสามารถสรุปได้ว่า รูปแบบการกลายพันธุ์ (spectrum of mutation) ที่ศึกษาได้เป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ของกลุ่มประชากรในภาคใต้ของประเทศ

เทคนิคการตรวจกรองที่ศึกษาในการวิจัยนี้คือ วิธีตรวจความเปราะของเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลองเดียว ซึ่งสามารถปฏิบัติได้ง่าย ใช้น้ำยาตัวเดียวคือ 0.36% NaCl และใช้เวลาน้อยคือประมาณ 10 นาที จากผลการทดลอง (ตารางที่ 6) พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ตรวจโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช ตรวจพาหะบีตาธาลัสซีเมีย และตรวจโรคบีตาธาลัสซีเมีย ซึ่งผลตรวจทั้งหมดให้ความไว 100% ยกเว้นในกลุ่มพาหะฮีโมโกลบินอีมีความไวต่ำคือ 60% ความจำเพาะของวิธีนี้คือ 88.4% ในกลุ่มของพาหะฮีโมโกลบินอีต้องใช้วิธีตกตะกอนด้วยสี DCIP ร่วมด้วย ซึ่งจะให้ความไว 100% (ตารางที่ 7) เพราะฉะนั้นวิธีการตรวจกรองที่เหมาะสมควรใช้ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวร่วมกัน ข้อควรระวังในการทำการทดสอบทั้ง 2 วิธี คือ การรักษาสภาพความเป็นกรดด่างและความเข้มข้นของน้ำยา ไม่ควรใช้น้ำยาที่เก็บไว้นานเกิน 1 เดือน และน้ำยาสำรอง (stock solution) ควรเก็บไว้ที่ 4°C การดูดเลือดตัวอย่างก็สำคัญ ปริมาตรที่ใช้ต้องแม่นยำ ต้องเช็ดปลายไปเป็ตทิปทุกครั้ง โดยเฉพาะวิธีตรวจความเปราะของเม็ดเลือดแดง ปริมาตรของเลือดที่ใส่ในน้ำกลั่น และใน 0.36% NaCl ต้องมีปริมาตรเท่ากัน ไปเป็ตทิปที่ล้างใช้ซ้ำควรตรวจดูการปนเปื้อนหรือรอยหักงอทุกครั้ง เพราะจะทำให้ปริมาตรคลาดเคลื่อนได้ เลือดที่เก็บไว้นาน หรือเก็บในน้ำยากันเลือดแข็งที่ไม่เหมาะสม อาจให้ค่าตรวจสอบคลาดเคลื่อนได้

จากการทดสอบกรองทั้ง 2 วิธีดังกล่าวข้างต้น เมื่อใช้ร่วมกัน ทำให้สามารถตรวจธาลัสซีเมียได้ทุกชนิด (100% sensitivity) แต่มีข้อเสียคือ มีความจำเพาะต่ำ โดยเฉพาะวิธีทดสอบความเปราะเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้เพราะผู้ป่วยที่ขาดเหล็ก หรือเป็นโรคเกี่ยวกับความผิดปรกติของเม็ดเลือดแดงชนิดอื่น จะให้ผลบวกด้วย ในการวิจัยนี้ได้ทดลองใช้วิธีย้อมอินคลูชั่นเพื่อวินิจฉัยพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียและโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช (ตารางที่ 8) ผลการทดสอบมีความจำเพาะสูง (100% specificity) ไม่มีผลบวกลวงในกลุ่มธาลัสซีเมียชนิดอื่น และกลุ่มคนปรกติ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ข้อเสียของวิธีนี้คือความไวค่อนข้างต่ำ (75.6% ในกลุ่มพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย) ต้องอาศัยความชำนาญในการดูเม็ดอินคลูชั่นในเม็ดเลือดแดงด้วยกล้องกำลังขยาย 400 เท่า วิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็นวิธีตรวจกรอง แต่ควรนำมาใช้ในการตรวจยืนยันผลการตรวจพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

ขั้นตอนสำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียคือ การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ และการพิจารณายุติการตั้งครรภ์ถ้าหากทารกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง วิธีการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ให้ผลแม่นยำและสามารถตรวจได้ตั้งแต่อายุครรภ์น้อยๆ คือ การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ วิธีตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอมีหลายวิธี และแต่ละวิธีจะมีความเหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์แต่ละชนิด เนื่องจากแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ส่วนใหญ่เกิดจากจีนขนาดใหญ่แหว่งหายไป และพบว่าส่วนใหญ่เป็นชนิด SEA และทราบตำแหน่งจีนขาดหายแน่นอน วิธีการตรวจจึงไม่ยุ่งยาก ทำได้โดยออกแบบไพรเมอร์ให้คร่อมรอยต่อตำแหน่งที่จีนแหว่งหายนั้น แล้วทำพีซีอาร์และอิเล็กโตรโฟริซิส ที่เรียกว่าวิธี gap-PCR (รูปที่ 10) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ายังมีผู้ป่วยที่อีกหลายรายที่ให้ผลลบกับวิธีตรวจนี้ (ตารางที่ 5) จึงเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยเหล่านี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ชนิดอื่น ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป ส่วนการวินิจฉัยบีตาธาลัสซีเมีย ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด วิธีที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ วิธีโอลิโกโพรบไฮบริไดเซชั่น และในการทดลองครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีที่ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี โดยใช้ดิกออกซิจินินติดฉลากกับโพรบแทน ทำให้วิธีทำสะดวก ปลอดภัย ลดต้นทุนการตรวจ และที่สำคัญน้ำยามีความคงทน เก็บไว้ที่ -20°C ได้นานหลายปี อย่างน้อย 5 ปี ยังไม่เสื่อมสภาพ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจในการ

ตรวจประจำวัน ความไว ความจำเพาะ และการใช้น้ำยาซ้ำ สามารถทำได้เช่นเดียวกับการใช้สารกัมมันตรังสี ส่วนบีตาธาลัสซีเมียที่เกิดจากจีนขนาดใหญ่แหว่งหายไป เช่น ชนิด 105 เบส และชนิดที่พบบ่อยในภาคใต้คือชนิด 3485 เบส ได้พัฒนาวิธีพีซีอาร์เช่นเดียวกับวิธีในการตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด SEA มาใช้ตรวจ (รูปที่ 11)

จากการศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของจีนบีตาธาลัสซีเมีย (spectrum of β-thalassemia mutations) ในประชากรภาคใต้ที่มารับบริการที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ พบว่าชนิดของการกลายพันธุ์และความถี่มีความแตกต่างจากการกลายพันธุ์ในภาคอื่นของประเทศ (ตารางที่ 1 และ 9) โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ชนิด IVS 1#5 ชนิด codon 19 ชนิด IVS 1#1 และ ชนิด 3.5 kb deletion มีความถี่สูงกว่าภาคอื่นๆ ของประเทศ และการกลายพันธุ์เหล่านี้พบได้บ่อยเช่นกันในประเทศมาเลเซีย ซึ่งมีเขตแดนติดต่อกับภาคใต้ของไทย แสดงว่ามีการเคลื่อนย้ายถิ่นฐานในกลุ่มประชากร 2 กลุ่มนี้ นอกจากนี้การติดต่อค้าขายทางทะเลในอดีตมีส่วนสำคัญในการเคลื่อนย้ายการกลายพันธุ์ดังกล่าว พบว่าชนิดของการกลายพันธุ์ในภาคใต้มีมากชนิดกว่าภาคอื่นของประเทศ โดยเฉพาะการพบการกลายพันธุ์ชนิด IVS 1#1 (G-A) ในประชากรภาคใต้ ซึ่งเป็นชนิดการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อย และมีต้นกำเนิดในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน จึงสันนิษฐานได้ว่าการกลายพันธุ์ชนิดนี้น่าจะมีการเคลื่อนย้ายจากการติดต่อค้าขายทางทะเลกับประเทศในทวีปยุโรปเมื่อ 200 ปีก่อน การกลายพันธุ์อีก 2 ชนิดที่พบเฉพาะในภาคใต้คือ การกลายพันธุ์ชนิด Cap site (A-C) ซึ่งเคยมีรายงานและพบได้บ่อยในคนอินเดีย และชนิด 105 bp deletion เป็นการกลายพันธุ์ที่พบใหม่ ได้ตรวจพบในครอบครัวผู้ป่วยซึ่งมีภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช จึงถือว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดในคนไทยภาคใต้ จากการศึกษาจนทราบชนิดของการกลายพันธุ์และการกระจายของการกลายพันธุ์แต่ละชนิดในประชากรภาคใต้ ทำให้สามารถวางแผนและดำเนินการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในบริเวณนี้ได้ โดยเฉพาะประโยชน์ในการให้คำปรึกษาและการให้บริการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ นอกจากนี้จากผลการศึกษาพบว่ายังมีการกลายพันธุ์อีกจำนวนหนึ่ง (3.1%) ที่ยังไม่ทราบชนิด หลังจากศึกษาจีนเหล่านี้โดยวิธี ASO-probe hybridization และ direct DNA sequencing ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญในการให้บริการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ และต้องมีการศึกษากันต่อไป เพื่อให้แผนการควบคุมและป้องกันโรคมีความสำเร็จสูงสุด

จากการทดลองนำขบวนการทดสอบดังกล่าวข้างต้น มาเปิดให้บริการแก่ผู้มารับบริการที่คลินิคฝากครรภ์ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยให้บริการแนะนำเกี่ยวกับธาลัสซีเมียแก่สตรีที่มีอายุครรภ์ต่ำกว่า 16 สัปดาห์ และให้บริการตรวจเลือดโดยวิธีตรวจกรอง เมื่อให้ผลบวก จะนำมาตรวจโดยวิธีมาตรฐาน ถ้าให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐาน จะแนะนำให้สามีมาตรวจ เพื่อหาคู่เสี่ยงและแนะนำให้ตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ต่อไป ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2537 ถึงเดือนตุลาคม 2538 ได้ตรวจกรองสตรีมีครรภ์ทั้งหมด 1390 ราย ให้ผลบวก 378 ราย (ร้อยละ 27.2) (ตารางที่ 10) และในจำนวน 378 รายให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐาน 334 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.4 ของผลตรวจกรอง หรือร้อยละ 24 ของสตรีตั้งครรภ์ทั้งหมด (ตารางที่ 11) ในจำนวน 334 ราย มีสามีมาตรวจ 247 ราย คิดเป็นร้อยละ 74 ของจำนวนภรรยาที่ผิดปรกติ และพบว่าสามีผิดปรกติ 71 ราย (ร้อยละ 28.7) และในจำนวนนี้ได้วิเคราะห์หาคู่เสี่ยง พบว่ามีทั้งหมด 27 คู่ คิดเป็นร้อยละ 1.9 ของสตรีที่ได้ตรวจกรองทั้งหมด (ตารางที่ 12) จะเห็นได้ว่าปัญหาที่สำคัญของโครงการนี้คือความร่วมมือของสามี ที่ให้ความร่วมมือน้อย ทั้งนี้อาจเกิดจากความไม่เข้าใจ หรือ

เกิดจากขบวนการในแผนการให้บริการไม่มีคุณภาพ โดยเฉพาะการให้ความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทั่วถึง ซึ่งต้องดำเนินการศึกษาถึงปัญหาที่แท้จริงและหาแนวทางแก้ไขต่อไป

จากผลการวินิจฉัยทารกในครรภ์ทั้งหมด 31 ราย ประกอบด้วย 27 รายจากแผนการป้องกันโรคดังกล่าวข้างต้น และ 4 รายจากครอบครัวที่เคยมีลูกเป็นโรคธาลัสสซีเมีย จากผลการวินิจฉัยในตารางที่ 13 ไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ 2 ราย ทั้งนี้เพราะไม่สามารถตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ในพ่อหรือแม่ได้ ปัญหาเกิดผู้ใช้บริการส่วนใหญ่มารับบริการเมื่ออายุครรภ์มากแล้ว ทำให้ไม่มีเวลาเพียงพอในการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ ซึ่งในบางรายจำเป็นต้องใช้วิธีวิเคราะห์เฮปโปรไทด์มาช่วยในการวินิจฉัย

การพัฒนาวิธีตรวจทางอิมมูโนวิทยา คณะผู้วิจัยได้พยายามผลิตแอนติบอดีที่จะนำมาใช้ในการวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมีย เช่น แอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินบาร์ท แอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินเฮ็ช และแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินพอร์ทแลนด์ เพื่อนำมาตรวจหาระดับฮีโมโกลบินเหล่านี้ในเลือดผู้ป่วย แต่ผลการทดลองที่ได้ไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ทั้งนี้เพราะแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่มีความจำเพาะ และให้ปฏิกิริยาที่ต่ำ (ตารางที่ 13-15) ซึ่งอาจเกิดจากการความผิดพลาดในการเตรียมฮีโมโกลบินเพื่อใช้เป็นแอนติเจน เตรียมได้ไม่บริสุทธิ์เพียงพอ หรืออาจเกิดจากความไม่เสถียรของฮีโมโกลบินเหล่านี้ในบางสภาวะ คณะผู้วิจัยไม่สามารถทำการทดลองซ้ำได้ เนื่องจากมีปัญหาในด้านสัตว์ทดลอง และได้พยายามติดต่อหาซื้อจากบริษัทที่ผลิตแอนติบอดีเหล่านี้ เพื่อนำมาทดลองนำร่อง แต่ไม่สามารถหาซื้อได้ โดยเฉพาะแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินเฮ็ชที่เคยมีการผลิตเพื่อการค้า แต่ปรากฏว่าบริษัทได้เลิกผลิตแอนติบอดีชนิดแล้ว คณะผู้วิจัยจึงได้สั่งซื้อแอนติบอดีต่อโกลบิน 3 ชนิดที่มีขายในตลาดคือ แอนติบอดีต่อโกลบินแอลฟา ต่อโกลบินเดลตา และต่อโกลบินบีตา มาทดสอบความจำเพาะและความไวในการทำปฏิกิริยา ซึ่งได้ผลดีดังแสดงในตารางที่ 17-19 และรูปที่ 16-18 และได้นำมาประยุกต์หาระดับของโกลบินทั้ง 3 ชนิด ในเลือดผู้ป่วยโดยวิธี ELISA (ตารางที่ 19) แล้วคำนวณสัดส่วนของค่า OD คือ OD anti-delta / OD anti-beta และ OD anti-alpha / OD anti-beta แล้วเปรียบเทียบค่าสัดส่วนดังกล่าวในตัวอย่างกลุ่มต่างๆ คือ กลุ่มคนปรกติ กลุ่มพาหะบีตา กลุ่มโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช กลุ่มพาหะแอลฟา เป็นต้น พบว่าสัดส่วนของ ODanti-delta/ODanti-beta มีความแตกต่างกันชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มคนปรกติและกลุ่มพาหะบีตาธาลัสซีเมีย โดยใช้ค่า 0.2 เป็นค่าพิจารณาความแตกต่าง (cut off value) คือถ้าค่าสัดส่วนมากกว่า 0.2 ให้การวินิจฉัยว่าเป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมีย ให้ผลความไวและความจำเพาะ 100% และค่าสัดส่วนของ ODanti-alpha/ODanti-beta มีความแตกต่างกันชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปรกติและกลุ่มพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และกลุ่มโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช โดยใช้ค่า 0.6 เป็นค่าพิจารณาความแตกต่าง (cut off value) คือถ้าค่าสัดส่วนน้อยกว่า 0.6 ให้การวินิจฉัยว่าเป็นพาหะจีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 หรือโรคฮีโมโกลบินเฮ็ช ซึ่งให้ผลความไวและความจำเพาะ 100% เช่นกัน อย่างไรก็ตามวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นมานี้ถึงแม้มีความไวและความจำเพาะสูง แต่มีข้อจำกัดหลายอย่างในการนำไปใช้ เช่น เครื่องมือที่ใช้มีความซับซ้อน ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญและมีประสพการณ์ ทุกขั้นตอนต้องการความละเอียด ความแม่นยำ ถ้าจะให้ใช้ได้ผลจริงๆ จะต้องพัฒนาเครื่องมืออัตโนมัติเข้ามาช่วยเพื่อให้มีความเที่ยงในขั้นตอนต่างๆ

สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียต้องอาศัยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญคือ

1. วิธีการตรวจกรอง ต้องเป็นวิธีที่มีความไวสูง จะต้องไม่ให้ผลลบลวง (false negative) ยอมรับผลบวกลวงได้แต่ไม่ควรจะมากเกินไป จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าวิธี one tube osmotic fragility test และวิธี DCIP precipitation test เมื่อใช้ร่วมกัน เป็นวิธีตรวจกรองที่เหมาะสมสำหรับเบตาธาลัสซีเมีย แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 โรคฮีโมโกลบินเฮ็ช และฮีโมโกลบินอี ในแต่ละโรงพยาบาลควรเปิดให้บริการตรวจธาลัสซีเมียโดยวิธีตรวจกรองนี้ได้

ข้อควรระวัง คือ

- การเตรียมและเก็บน้ำยาต้องรักษาความเข้มข้น และสภาพความเป็นกรดด่างให้คงที่
- การดูดเลือดตัวอย่างต้องตรวจเช็คปริมาตรให้แม่นยำและคงที่

2. วิธีมาตรฐาน เพื่อใช้ตรวจยืนยันผลและตรวจแยกชนิดธาลัสซีเมีย เป็นวิธีที่สำคัญ ไม่ควรให้ผลบวกลวง วิธีที่นิยมใช้คือ วิธี cellulose acetate electrophoresis และ celulose strip elution technic หรือ microcolumn chromatography โรงพยาบาลประจำจังหวัดควรให้บริการเทคนิคนี้ได้ เพื่อช่วยตรวจยืนยันผลผู้ป่วยที่ส่งต่อมาจากโรงพยาบาลประจำอำเภอ

3. วิธีการตรวจดีเอ็นเอเพื่อหาชนิดการกลายพันธุ์ จะต้องตรวจให้ทราบชนิดการกลายพันธุ์ในพ่อแม่ก่อน ก่อนดำเนินการตรวจทารกในครรภ์ ทั้งนี้เพื่อให้ผลการตรวจทารกในครรภ์มีความถูกต้องแม่นยำและได้ผลเร็ว วิธีการตรวจดีเอ็นเอที่ได้พัฒนาจากการวิจัยนี้ได้นำดิกออกซิจินินซึ่งเป็น hepten มาติดฉลากกับโพรบแทนสารกัมมันตรังสี ทำให้สามารถทำการทดสอบได้สะดวก และให้ผลการทดสอบเทียบเท่ากับการใช้สารกัมมันตรังสี อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าว ไม่สามารถตรวจชนิดการกลายพันธุ์ที่ยังไม่ทราบชนิดได้ ซึ่งจะต้องอาศัยวิธีการหาลำดับเบส (DNA sequencing)

ข้อควรระวังในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์คือ การปนเปื้อนดีเอ็นเอของแม่ ซึ่งจะทำให้ผลตรวจผิดพลาด จึงควรตรวจเช็คการปนเปื้อนทุกครั้งด้วยวิธี haplotype analysis ของจีนกลุ่มบีตาโกลบิน หรือวิธีวิเคราะห์ VNTR locus 180 โดยเฉพาะวิธี haplotype analysis สามารถนำไปใช้ตรวจทารกในครรภ์ได้โดยใช้หลักการของ linkage analysis

จีนบีตาธาลัสซีเมียที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้มี 15 ชนิด (รวมชนิดฮีโมโกลบินอี) มี 7 ชนิดที่พบได้บ่อย คือ ชนิด 4 bp deletion ที่ codon 41/42 ชนิด IVS 1#5 (G-C) ชนิด codon 19 (AAC-AGC) ชนิด codon 17 (AAG-TAG) ชนิด IVS 1#1 (G-T) ชนิด -28 (A-G) และ ชนิด 3.5 kb deletion ซึ่งพบประมาณ 91.5% และมี 3 ชนิด ที่พบครั้งแรกในคนไทย คือ ชนิด Cap site (A-C) ชนิด IVS 1#1 (G-A) และชนิด 105 bp deletion จากผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถวางแผนการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในคู่สามีภรรยา และทารกในครรภ์ได้ โดยเริ่มจากการตรวจหาการกลายพันธุ์ชุดที่พบบ่อยก่อน ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธีการตรวจที่เหมาะสมยิ่งขึ้น

ปัญหาที่สำคัญที่สุดในการให้บริการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ คือการที่ไม่สามารถตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ในพ่อและ/หรือแม่ได้ ทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยทารกในครรภ์ได้ ซึ่งทำให้มีความยุ่งยากในการ

ให้คำแนะนำปรึกษา และการที่ลักษณะการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียมีหลายชนิด และแต่ละชนิดทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงต่างกัน ก็เป็นปัญหาในการให้คำปรึกษา หรือตอบคำถามของผู้ป่วย เพราะฉนั้นการวางแผนเพื่อศึกษาให้ทราบรายละเอียดและมีข้อมูลที่ถูกต้องเพื่อนำมาแก้ปัญหาดังกล่าว มีความจำเป็นที่ต้องทำเร่งด่วนและทำให้เป็นระบบเดียวกันทั่วประเทศ

การพัฒนาวิธีตรวจทางด้านอิมมูโนวิทยา โดยการตรวจหาระดับของโกลบินแอลฟา โกลบินบีตา และโกลบินเดลตา ด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีที่น่าจะพัฒนาไปใช้ตรวจกรองธาลัสซีเมียได้ ถ้ามีการศึกษาและพัฒนาเครื่องมืออัตโนมัติมาใช้

บรรณานุกรม

1. วิจารณ์ พานิช. ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปรกติในประเทศไทย. สงขลานครินทร์เวชสาร 2534; 9.

2. Wasi P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. In : Distribution and evolution of hemoglobin and globin loci. James E. Bowman eds. New York: Elsevier, 1983; 179-208.

3. Fucharoen S. Hemoglobinopathies in Southeast Asia: Molecular Biology and clinical medicine. Hemoglobin 1997; 21: 299-319

4. Panich V, Pornpatkul M, Sriroongrueng W. The problem of thalassemia in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992; 23 [Suppl 2]:1-6.

5. Kazazian HH Jr. The thalassemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. Semin Hematol 1990; 27:209.

6. Higg DR, Vickers MA, Wikie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α-globin gene cluster. Blood 1989; 73: 1081-1103.

7. Winichagoon P, Higgs DR, Goodbourn SEY, Cleeg JB, Weatherall DJ, Wasi P. The molecular basis of a-thalassemia in Thailand. EMBO J 1984; 3: 1813-1818.

8. Chang JG, Lee LS, Lin CP, Chen Ph, Chen CP. Rapid diagnosis of α-thalassemia 1 of Southeast Asia type and Hydrops fetalis by polymerase chain reaction. Blood 1991; 78: 853-854.

9. Ko TM, Hsieh FS, Hsu PM, Lee TY. Molecular Characterization of Severe α-Thalassemia Causing Hydrops Fetalis in Taiwan. Am J Med Genet 1991; 39:317-320.

10. Bowden DR, Viskers MA, Higgs DR. A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of α-thalassemia. Br J Haematol 1992; 81:104-108.

11. Fishel-Ghodsian N, Vickers MA, Seip M, Winichagoon P, Higg DR. Characterization of two deletions that remove the entire human ζ-α globin gene complex ($--^{Thai}$ and $--^{Fil}$). Br J Haematol 1988; 70: 233-237

12. Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E. A syllabus of thalassemia mutations (1997). Ausgusta: Sickle Cell Anemia Foundation, 1997.

13. Fucharoen SP, Fucharoen G, Sriroongrueng W, Laosombat V, Jetsrisuparb A, Prasatkaew S, et al. Molecular basis of β-thalassemia in Thailand: analysis of β-thalassemia mutations using the polymerase chain reaction. Hum Genet 1989; 84: 41-46.

14. Winichagoon P, Fucharoen S, Thonglairoam V, Tanapotiwirut V, Wasi P. β-Thalassemia in Thailand. Ann NY Acad Sci U.S.A. 1990; 612: 31-43.

15. Fukumaki Y, Fucharoen S, Fucharoen G, Okamoto N, Ichinose M, Jetsrisuparb A,

et al. Molecular heterogeneity of β-thalassemia in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992: 23 [suppl 2]:14-21.

16. Laosombat V, Fucharoen SP, Panich V, Fucharoen G, Wongchanchailert M, Sriroongrueng W, *et al.* Molecular basis of beta thalassemia in the south of Thailand. Am J Hematol 1992; 41:194-198.

17. Nopparatana C, Panich V, Saechan V, Sriroongrueng V, Nopparatana CH, Rungjeadpha J, *et al.* The spectrum of β-thalassemia mutations in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995; 26 [suppl 1]: 229-234.

18. Hunt DM, Higgs DR, Winichagoon P, Clegg JB, Weatherall DJ: Haemoglobin Constant Spring has an unstable a-chain messenger RNA. Br J Haematol 1982; 51: 405-413.

19. Thonglairoam V, Winichagoon P, Fucharoen S, Tanphaichitr VS, Pung-amritt P, Embury SH, Wasi P. Hemoglobin constant spring in Bangkok: molecular screening by selective enzymatic amplification of the alpha 2-globin gene. Am J Hematol 1991; 38: 277-280.

20. Sanguansermsri T, Pape M, Laig M, Hundriser J, Flatz G. β^0-thalassemia in a Thai family is caused by a 3.4 kb deletion including the entire β-globin gene. Hemoglobin 1990; 14: 157-168.

21. Lynch JR, Brown JM, Best S, Jennings MW, Weatherall DJ. Characterization of the breakpoint of a 3.5-kb deletion of the β-globin gene. Genomics 1991; 10: 509-511.

22. Kattamis C, Efremov G, Pootrakul S,. Effectiveness of one tube osmotic fragility screening in detecting β-thalassemia trait. J Med Genet 1981; 18: 266-270.

23. Kulapongs P, Sanguansermsri T, Mertz G, Tawarat S. Dichlorophenolindophenol (DCIP) precipitation test: a new screening test of Hb E and H. Pediat Soc Thailand 1976; 15:1-7.

24. Maungsapaya W, Winichagoon P, Fucharoen S, Pootrakul P, Wasi P. Improved technique for detecting intraerythrocytic inclusion bodies in a-thalassemia trait. J Med Assoc Thai 1985; 68:43-45.

25. Shyamala M, Kiefer CR, Moscoso H, Garver FA. Application of a Monoclonal Antibody Specific for the d Chain of Hemoglobin A2 in the Diagnosis of β-Thalassemia. Am J Hematol 1991; 38:214-219.

26. Garver FA, Singh H, Kestler DP, McGuire BS. Identification and quantification of hemeglobin A2 and Barts with an enzyme-labeled immunosorbent assay . Clin Chem 1985; 30:1205.

27. Shyamala M, Kiefer CR, Moscoso H, Graver FA. Simple and rapid enzyme-linked

immunosorbent assay for the detection of the hemoglobin C [α2β26(A3) Glu-Lys] in cord blood using a monoclonal antibody. Am J Hematol 1990; 33:198.

28. Garver FA, Moscoso H, Swamy S, Kiefer CR: Generation of a monoclonal antibody specific for Hb G-Philadelphia [α2 68(E17)Asn-Lysβ2] and development of an immunoassay. Hemoglobin 1988; 12: 125.

29. Kiefer CR, Moscoso H, Shyamala M, Garver FA. Characterization and application of a monoclonal antibody with dual specificity for hemoglobins S and C. J Lab Clin Med 1988; 112:760.

30. Moscoso H, Shyamala M, Kiefer CR, Garver FA. Monoclonal antibody to the γ-chain of human fetal hemoglobin used to develop an enzyme immunoassey. Clin Chem 35:2066, 1989

31. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985;230:1350-1354.

32. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, *et al.* Diagnosis of sickle cell anemia and β-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med 1988;319:537

33. Fucharoen S, Fucharoen G, Ata K, Aziz S, Hashim S, Hassan K, Fukumaki Y. Molecular characterization and nonradioactive detection of beta-thalassemia in Malasia. Acta Haematol 1990;84:82.

34. Efremov DG, Dimovski AJ, Efremov GD. Detection of β-thalassemia mutations by ASO Hybridization of PCR amplified DNA with digoxigenin ddUTP labeled oligonucleotides. Hemoglobin 1991;15:525.

35. Nopparatana C, Panich V, Saechan V, Nopparatana CH, Rungjeadpha J, Pornpatkul M, et al. Nonradioactive Hybridization of PCR-Amplified DNA for Detection of β-Thalassemia Mutation. In : Fucharoen S, Winichagoon P, Kattamis C, Bernini L, eds. The Detection of Single-base Mutations : A Laboratory Manual. Bangkok 1994b; 20-24.

36. Bowden DR, Viskers MA, Higgs DR. A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of α-thalassemia. Br J Haematol 1992; 81:104-108

37. Winichagoon P, Fucharoen S, Kanokpongsakdi S, Fukumaki Y. Detection of α-thalassemia 1 (Southeast Asian type) by polymerase chain reaction : Its application to Thai population. Clin Genet 1995; 47: 318-320.

38. Chang JG, Lee LS, Lin CP, Chen Ph, Chen CP. Rapid diagnosis of α-thalassemia 1 of Southeast Asia type and Hydrops fetalis by polymerase chain reaction. Blood 78; 853:1991.

39. Sanger F, Nicklen S, Coulsen R: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463, 1977

40. Trifillis P, Loannou P, Schwartz E, Surrey S. Identification of Four Novel δ-Globin Gene Mutations in Greek Cypriots Using Polymerase Chain Reaction and Automated Fluorescence-Based DNA Sequence Analysis. Blood 1991; 78:3298-3305

41. Foglietta E, Deidda G, Graziani B, Modiano G, Bianco I. Detection of α-globin gene disorders by a simple PCR methology. Haematologica 1996; 81: 387-396.

42. Fucharoen SP, Fucharoen G, Fukumaki Y. Simple non-radioactive method for detecting haemoglobin Constant Spring gene. Lancet 1990; 335:1527.

43. Chamnong Nopparatana. Reverse Dot Blot Hybridization: A Screening Technique for β-Thalassemia Alleles. In : Fucharoen S, Winichagoon P, Kattamis C, Bernini L, eds. The Detection of Single-base Mutations : A Laboratory Manual. Bangkok 1994c; 31-35.

44. Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF. Reverse dot blot probes for the screening of β-thalassemia mutations in Asians and American Blacks. Hum Mutat 1994; 3: 59-63.

45. Nopparatana C, Panich V, Nopparatana CH, Rungjeadpha J, Pornpatkul M, Laosombat V, *et al.* Automated DNA sequence analysis of β-globin gene. In : Fucharoen S, Winichagoon P, Kattamis C, Bernini L, eds. The Detection of Single base Mutations : A Laboratory Manual. Bangkok 1994a; 90-94.

46. Tamary H, Surrey S, Kirschmann H, Shalmon L, Zaizov R, Schwartz E, *et al.* Systematic use of automated fluorescence-based sequence analysis of amplified genomic DNA for rapid detection of point mutations. Am J Heamatol 1994; 46: 127-133.

47. Popovich BA, Rosenblatt DS, Kendall AG, Nishioka Y. Molecular characterization of an atypical β-thalassemia caused by a large deletion in the 5' β-globin gene region. Am J Hum Genet 1986; 39:797-810.

48. Huisman THJ and Jonxis JHP. The hemoglobinopathies : Technique of identification. New York 1977

49. Schroeder WA, and Huisman THJ. The chromatography of hemoglobin. Marcel Dekker, New York 1980

50. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี และ ศิริวรรณ แย้มน้อย ธาลัสซีเมีย คู่มือสำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2532

ผลงานวิจัยตีพิมพ์

1. C. Nopparatana, V. Saechan, Ch. Nopparatana, M. Pornpatkul, V. Panich, Y. Fukumaki. A Novel 105 Basepair Deletion Causing β-Thalassemia in Members of A Thai Family. Am J Hematol 1999, 61:1-4.

2. C. Nopparatana, V. Panich, V. Saechan, Ch. Nopparatana, J. Rungjeadpha, M. Pornpatkul, V. Laosombat, Y. Fukumaki. The Spectrum of β-Thalassemia Mutation in Southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1995, 26 (Supp 1):229.

3. V. Laosombat, C. Nopparatana, M. Wongchanchailert, A. Wiriyasateinkul Molecular basis of beta-thalassemia in Thai Muslim patients in the south of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1997, 28 (Supp 3):104.

4. V. Laosombat, M. Wongchanchailert, B. Sattayesevana, C. Nopparatana. Clinical, hematological and molecular fetatures in Thais with b-Malay/b-thalassemia and β-Malay/ Hb E. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1997, 28 (Supp 3):106.

5. W. Sriroongrueng, E. Sehleiemacher, V. Panich, C. Nopparatana, V. Sachan, V. Laosombat, M. Pornpatkul, Y. Fukumaki. Analysis of Beta-Thalassemia and Beta-Locus Control Region Hypersenitive Sites 2,3 and 4 In Southern Thailand. Southeast Asian Journal of Topical Medicine and Public Health Volume 28 Supplement 3, 1997(120-127).

6. V. Laosombat, C. Nopparatana, M. Wongchanchailert, A. Wiriyasateinkul Molecular Basis of Beta-Thalassemia in Thai Muslim Patients in the South of Thailand. Southeast Asian Journal of Topical Medicine and Public Health Volume 28 Supplement 3, 1997(104-105).

7. V. Laosombat, M. Wongchanchailert, B. Sattayasevana, C. Nopparatana. Clinical, hematological and molecular features in Thais with Beta-Malya/Beta thalassemia and Beta-Malay/HbE. Southeast Asian Journal of Topical Medicine and Public Health Volume 28 Supplement 3, 1997(106-109).

8. จำนงค์ นพรัตน์. Oligonucleotide Synthesis. ใน : ธาลัสซีเมีย-การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR. ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ, สุทัศน์ ฟู่เจริญ บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร: โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2541; 68-72.

9. ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ, จำนงค์ นพรัตน์, สุพรรณ ฟู่เจริญ. Sample collection and preparation of genomic DNA. ใน : ธาลัสซีเมีย-การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR. ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ, สุทัศน์ ฟู่เจริญ บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร : โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2541; 73-90.

10. ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ, รุ่งรัตน์ ศรีพาณิชย์, จำนงค์ นพรัตน์. Detection of 105 bp and 3.4 kb-deletion types of β-thalassemia. ใน : ธาลัสซีเมีย-การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR.

ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ, สุทัศน์ ฟู่เจริญ บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร : โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2541; 119-123.

11. จำนงค์ นพรัตน์. Detection of β-thalassemia mutations with digoxigenin (Dig)-labeled oligonucleotide probes. ใน : ธาลัสซีเมีย-การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR. ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ, สุทัศน์ ฟู่เจริญ บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร : โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2541; 157-165.

12. จำนงค์ นพรัตน์. Automated DNA sequencing. ใน : ธาลัสซีเมีย-การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR. ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ, สุทัศน์ ฟู่เจริญ บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร : โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2541; 197-204.

13. C. Nopparatana. Molecular Diagnosis of Thalassemias. Songkla Med J 1998, 16:145-159.

14. C. Nopparatana, V. Panich, V. Saechan, C. Nopparatana, J. Rungjeadpha, M. Pornpatkul, O. Koanantakul, R. Leetanaporn, Y. Fukumaki. Nonradioactive Hybridization of PCR-Amplified DNA for Detection of β-Thalassemia Mutation. Asia Pacific Course on the Detection of Single-base Mutations : A Laboratory Manual 1994: 20-24.

15. C. Nopparatana, V. Panich, C. Nopparatana, J. Rungjeadpha, M. Pornpatkul, Vichai Laosombat, Yasuyuki Fukumaki. Automated DNA Sequence Analysis of β-Globin Gene. Asia Pacific Course on the Detection of Single-base Mutations : A Laboratory Manual 1994: 90-94.