นิพนธ์ต้นฉบับ

ความชุกของพาหะ Alpha-thalassemia ของอาสาสมัครบุคลากรมหาวิทยาลัยพะเยา

เนรัฐชลา สุวรรณคนธ์[1] ธีรภัทร ศรีรัตนโชติ[2] ขวัญฤดี มหิงษา[3] ปฐมพงศ์ นามวงศ์[3] และ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี[3]

[1]คณะวิทยาศาสตร์ [2]คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ [3]หน่วยธาลัสซีเมีย สถาบันมนุษย์พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา

บทคัดย่อ

ความเป็นมา *Alpha (α)-thalassemia เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่พบบ่อยในเขตภาคเหนือ อาจส่งผลให้เกิดกลุ่มอาการ hydrops fetalis กับทารกในครรภ์และมักเสียชีวิตทุกราย โรค α-thalassemia เกิดได้จากการรวมตัวของยีน α-thalassemia หลายชนิด การให้บริการในการตรวจชนิดต่างๆ ของการกลายพันธุ์ของ α-thalassemia ก่อนการมีบุตร จะสามารถทำให้ผู้รับบริการที่เป็นพาหะนำผลการตรวจที่ได้ไปประกอบการวางแผนครอบครัวได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม* ***วัตถุประสงค์*** *เพื่อสำรวจความชุกของพาหะ α-thalassemia ชนิดต่างๆ ของอาสาสมัครบุคลากรที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ของมหาวิทยาลัยพะเยา และให้บริการให้คำปรึกษาในโครงการการป้องกันการมีบุตรเป็นโรค α-thalassemia* ***วัสดุและวิธีการ*** *ตัวอย่าง DNA 123 ตัวอย่าง จากอาสาสมัครฯ ถูกนำไปตรวจ α-thalassemia mutations ชนิดต่างๆได้แก่ α^0-thalassemia ชนิด Southeast Asian ($--^{SEA}$) deletion และชนิด Thai deletion ($--^{Thai}$) ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR (q-PCR) โดยใช้ fluorescence dye SYTO9 และการตรวจ α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{3.7}$ และ $-\alpha^{4.2}$ deletions ด้วยเทคนิค relative gene quantification real-time PCR และใช้เทคนิค high resolution DNA melting (HRM) analysis ในการตรวจ hemoglobin Constant Spring (Hb CS, CD142 TAA->CAA) ซึ่งเป็น non-deletion α^+-thalassemia อาสาสมัครทุกรายได้รับการแจ้งผลเป็นบันทึกข้อความ สำหรับรายที่เป็นพาหะได้รับบริการ thalassemia counseling เพื่อความเข้าใจเรื่องการป้องกันโรคธาลัสซีเมีย* ***ผลการศึกษา*** *พบผู้เป็นพาหะ α^0-thalassemia ชนิด $--^{SEA}$ จำนวน 16 ราย (ร้อยละ 13) พาหะ α^0-thalassemia ชนิด $--^{Thai}$ จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.8) พาหะ α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{3.7}$ deletion จำนวน 18 ราย (ร้อยละ 15) พาหะ α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{4.2}$ deletion จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 1.6) พาหะ Hb CS จำนวน 6 ราย (ร้อยละ 5) พบผู้ที่เป็น homozygous $-\alpha^{3.7}$ deletion จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 2.4) เป็น compound heterozygous $-\alpha^{3.7}$ deletion/ Hb CS จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 1.6) และพบ HbH disease ชนิด $\alpha^0(--^{SEA})/\alpha^+(-\alpha^{3.7})$ จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 2.4) เมื่อคำนวณเป็นความถี่ของยีนแต่ละชนิดพบว่า ความถี่ของยีน α^0-thalassemia เท่ากับ 0.081 ความถี่ของยีน α^+-thalassemia เท่ากับ 0.126 และความถี่ของยีน Hb CS เท่ากับ 0.033 เมื่อได้รับคำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ของโรคธาลัสซีเมียแล้ว อาสาสมัครมีความเข้าใจการป้องกันโรคธาลัสซีเมียมากขึ้น* ***สรุป*** *การศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจ DNA จากเลือดโดยตรงทั้งนี้เป็นเพราะ α^+-thalassemia trait ยังไม่มีวิธีตรวจคัดกรองที่เหมาะสม จากผลการตรวจพบว่ามี α-thalassemia gene ชนิดต่างๆ ในอัตราที่สูง เมื่อนำมาคำนวณตามทฤษฎีของ Hardy-Weinberg พบว่าคู่สมรส 1,000 คู่ อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous α^0-thalassemia จำนวน 7 ราย HbH disease (α^0-thalassemia/α^+-thalassemia deletions) จำนวน 20 ราย และ HbH/Hb CS disease (α^0-thalassemia/Hb CS) จำนวน 5 ราย ดังนั้นการตรวจความชุกของ α-thalassemia genotype ชนิดต่างๆ ของผู้ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ และการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสม น่าจะมีประโยชน์และช่วยให้ผู้เป็นพาหะของ α-thalassemia สามารถวางแผนครอบครัวได้อย่างถูกต้อง*

คำสำคัญ : *● ความชุก ● พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย ● บุคลากรวัยเจริญพันธุ์ของมหาวิทยาลัยพะเยา*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2557;24:129-36.

ได้รับต้นฉบับ 29 ธันวาคม 2556 รับลงตีพิมพ์ 4 เมษายน 2557

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ เนรัฐชลา สุวรรณคนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา E-mail: narutchala@gmail.com

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านทางยีนด้อย (autosomal recessive inheritance) และในเขตภาคเหนือเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปแล้วว่าพบมีอุบัติการณ์ของผู้เป็นพาหะของ α-thalassemia gene สูง[1-2] โรค α-thalassemia ได้แก่ homozygous α^0-thalassemia (hemoglobin Bart's hydrops fetalis) ผู้ป่วยด้วยโรคนี้เสียชีวิตทุกราย เกิดหัวใจวายจากการที่มีฮีโมโกลบินอยู่ในระดับต่ำมาก และไม่สามารถปรับตัวได้ มารดาที่ตั้งครรภ์อาจพบกับภาวะโรคแทรกซ้อนชนิดรุนแรงและเสียชีวิตได้ โรค α-thalassemia ชนิดนี้เกิดกับคู่สมรสที่มียีนแฝงชนิด α^0-thalassemia โรค α-thalassemia อีกชนิดคือ โรคฮีโมโกลบิน เอช (HbH disease) ผู้ป่วยด้วยโรคนี้มีภาวะโลหิตจางปานกลาง ระดับฮีโมโกลบินจะอยู่ที่ 7-10 กรัม ต่อ ดล. แต่เมื่อมีโรคติดเชื้อเกิดขึ้นสามารถเกิดภาวะ hemolytic crisis ระดับฮีโมโกลบินจะลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถปรับตัวได้และอาจมีอาการของหัวใจวายชนิดเฉียบพลัน ซึ่งต้องรักษาโดยการให้ blood transfusion ภาวะเช่นนี้ถ้าเกิดขึ้นกับทารกในครรภ์อาจแสดงอาการของกลุ่มอาการ hydrops fetalis ได้ ซึ่งต้องรักษาโดยการทำ intra-uterine blood transfusion โรค α-thalassemia ชนิดนี้เกิดกับคู่สมรสที่คนหนึ่งเป็นพาหะชนิด α^0-thalassemia และอีกคนหนึ่งเป็นพาหะชนิด α^+-thalassemia ได้แก่ ชนิด $-\alpha^{3.7}$ หรือ $-\alpha^{4.2}$ deletions หรือ Hb CS [3-7]

การศึกษาครั้งนี้เพื่อหาความชุกของ α-thalassemia gene ชนิดต่างๆ ของอาสาสมัครบุคลากร มหาวิทยาลัยพะเยา และให้บริการ thalassemia counseling เพื่อให้ผู้ที่เป็นพาหะสามารถวางแผนครอบครัวได้อย่างถูกต้อง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา เป็นตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครนิสิตและบุคลากร มหาวิทยาลัยพะเยา ที่มีภูมิลำเนาในจังหวัดพะเยา จำนวน 123 ราย การดำเนินการเก็บตัวอย่างในโครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

วิธีการ นำเลือดตัวอย่างแต่ละรายๆ ละ 200 ไมโครลิตร มาเตรียม DNA บริสุทธิ์ ตามขั้นตอนของ QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH., Hilden, Germany) โดย DNA ที่ได้ ก่อนนำไปใช้ต้องมีค่า absorbance ratio 260/280 อยู่ระหว่าง 1.6-1.8 และนำไปปรับให้มีความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเก็บ DNA ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

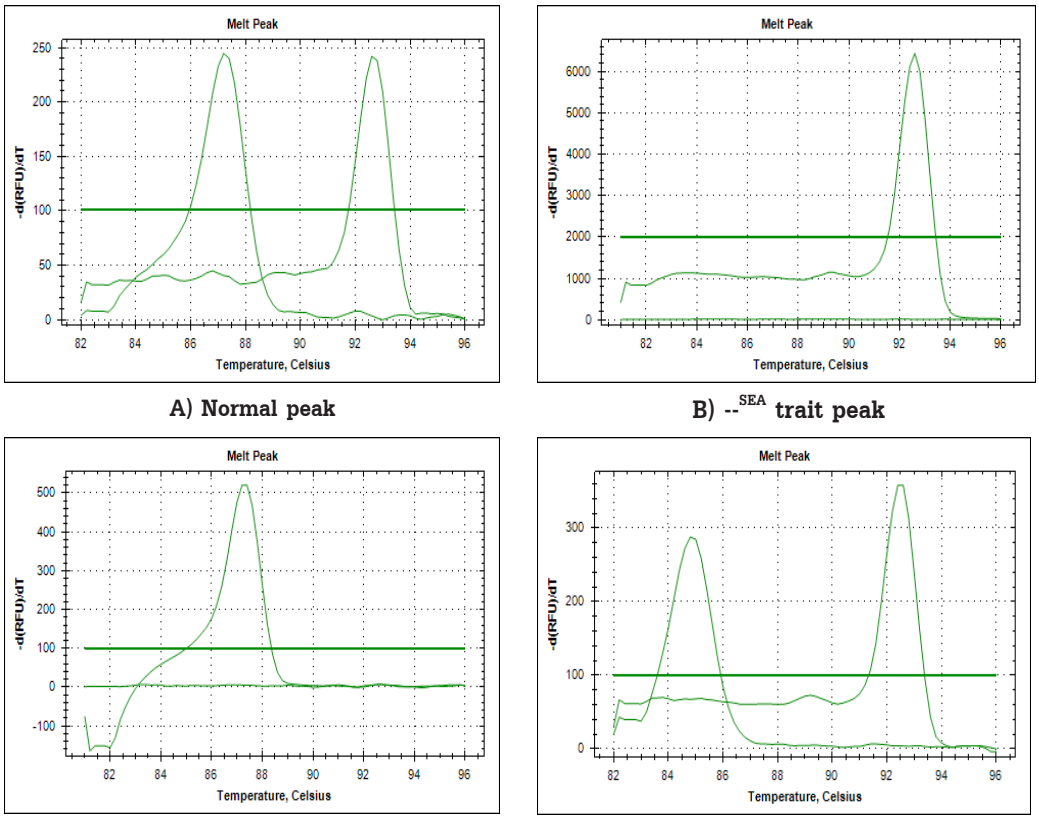
การดำเนินการตรวจ gene mutation ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ได้แก่ multiplex real-time PCR ด้วยระบบ intercalating dye เพื่อตรวจพาหะของ α^0-thalassemia ชนิด $--^{SEA}$ deletion และ $--^{Thai}$ deletion[8-9] ส่วนพาหะของ α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{3.7}$ และ $-\alpha^{4.2}$ deletions ใช้วิธี relative gene quantification real-time PCR สำหรับ non deletional α^+-thalassemia คือ Hb CS ตรวจด้วยวิธี HRM analysis[10] และตรวจยืนยัน $-\alpha^{3.7}$ และ $-\alpha^{4.2}$ deletions อีกครั้งด้วยวิธี conventional gap PCR สำหรับ Hb CS ยืนยันด้วยวิธี direct DNA sequencing technique[11-12]

การสร้าง Primers ใช้ program Primer-BLAST จากเวปไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast และ/หรือโปรแกรม Primer 3 จากเวปไซต์ http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0 ส่วน DNA sequence คัดลอกมาจาก NCBI's GenBank: Z84721 และชุดไพร์เมอร์ที่สร้างขึ้นสั่งเตรียมจากบริษัท Invitrogen Company, California, USA

Quantitative real-time PCR สำหรับการตรวจ α^0-thalassemia ชนิด $--^{SEA}$ deletion และ ชนิด $--^{Thai}$ deletion โดย $--^{SEA}$ deletion เกิดจาก α-globin gene ที่มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 19.3 กิโลเบส ซึ่งการขาดหายไปรวมถึง HBA1 และ HBA2 genes ด้วย โดยจุดเริ่มต้นของ gene deletion ที่ปลาย 5' break point อยู่ที่ NCBI reference Z84721 nucleotide number 26259 และยาวไปถึงที่ปลาย 3' break point บริเวณนิวคลีโอไทด์ number 2608 สำหรับ SEA-primers (SGE1, SGE2 และ SGE3) และ Thai-primers (T1 และ T2) ดังแสดงใน Table 1 ถูกสร้างขึ้นตามหลักของ Gap-PCR คือ forward primer SGE1 กับ reverse primer SGE2 ให้ PCR product ขนาด 152 คู่เบส และให้ optimal melt temperature ที่ 92.0 องศาเซลเซียส ใช้สำหรับตรวจ wild type และ forward primer SGE1 กับ reverse primer SGE3 ให้ PCR product ขนาด 117 คู่เบส ให้ melt peak ที่ 86.8 องศาเซลเซียส ใช้สำหรับตรวจ SEA gene และสำหรับการตรวจ $--^{Thai}$ deletion (33.45 kb deletion) ประกอบด้วย forward primerT1 และ reverse primerT2 ให้ melt peak ที่ 84.4 องศาเซลเซียส โดย mutiplex real-time PCR เพื่อการตรวจ α^0-thalassemia ชนิด $--^{SEA}$ และ ชนิด $--^{Thai}$ deletions ใช้ปริมาตรของปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร dNTP ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร SYTO9 ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร 5 units of Platinum®*Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร SGE1, SGE2, SGE3 ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ส่วน T1 และ T2 ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 8.15 ไมโครลิตร

Table 1 Sequence and location of the PCR primers

Name	Mutation type	Nucleotides (5'->3')	PCR size (bp)	NCBI ref. Number
HbCS-F	HbCS	CCA AGA CCT ACT TCC CGC AC		Z84721
HbCS-R	HbCS	GGC ACA TTC CGG GAT AGA GAG	613	Z84721
SGE1-F	RT-PCR SEA	GTC GTC CCC ACT GTC GTC		Z84721
SGE2-R	RT-PCR SEA	ACG CCG TCC GAC TCA AGG A	152	Z84721+Z69706
SGE3-R	RT-PCR SEA	GGC TTA CTG CAG CCT TGA AC	112	Z69706
T1-F	RT-PCR Thai	ACC ATA CGG TTC ACC CAT TT		Z84721
T2-R	RT-PCR Thai	GCT CCC TTG GAT CTG CAC CTC T		Z84721+Z69706
A-primer-F	RT-$\alpha^{3.7}$, -$\alpha^{4.2}$	TCC TGG CTT CTG TGA GCA CCG T		Z84721
A-primer-R	RT-$\alpha^{3.7}$, -$\alpha^{4.2}$	ACC AGG AAG GGC CGG TGC AAG	127	Z84721
B-primer-F	RT-$\alpha^{3.7}$, -$\alpha^{4.2}$	CAC CTC CAT TCT CCA ACC ACA G		Z84721
B-primer-R	RT-$\alpha^{3.7}$, -$\alpha^{4.2}$	AGT CTG AGA GTG TGG ACG AGC C	176	Z84721
C-primer-F	RT-$\alpha^{3.7}$, -$\alpha^{4.2}$	ACG CCT CCC TGG ACA AGT TC		Z84721
C-primer-R	RT-$\alpha^{3.7}$, -$\alpha^{4.2}$	AGA AGC ATG GCC ACC GAG GCT C	80	Z84721



A) Normal peak **B) --^{SEA} trait peak**

C) --^{Thai} trait peak **D) Hb Bart's hydropfetalis (--^{SEA}/--^{SEA}) peak**

Figure 1 Chromatogram of the multiplex real-time PCR representingthe optimal melt temperaturefor the detection of α^0-thalassemia gene. A) Normal peak; B) --^{SEA} trait peak; C) --^{Thai} trait peak; D) Hb Bart's hydrops fetalis (--^{SEA}/--^{SEA}) peak

การตรวจสอบชนิดของยีนทำตามขั้นตอนเครื่อง Bio-Rad CFX96 real-time system (Bio-Rad Laboratories, California, USA) ปรับปรุงบางขั้นตอนเพื่อให้ได้ผลดีที่สุด โดยมีสภาวะ PCR 40 รอบ เริ่มจาก activation *Taq* DNA polymerase ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ต่อด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส 15 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที โดยจะมีการบันทึกปริมาณของสี fluorescence SYTO9 จากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยาที่จบลง และเมื่อครบ 40 รอบ โปรแกรมมีการวิเคราะห์ผลเป็นภาพ melt peak (Figure 1)

Relative gene quantification real-time PCR สำหรับการตรวจพาหะ α^+-thalassemia ทำการตรวจชนิด -$\alpha^{3.7}$ และชนิด -$\alpha^{4.2}$ deletions ทำโดยวิธี relative gene quantification real-time PCR ตามวิธีของ Seeratanachot[10] มีรายละเอียดโดยสรุปดังนี้ ใช้ primer 3 ชุด คือ A-, B-และ C-primer (Table 1 และ Figure 2) A-primer ใช้สำหรับตรวจ α^+-thalassemia trait ชนิด -$\alpha^{4.2}$ deletion สร้างขึ้นจาก DNA sequence ตรงด้าน 3' ของ HBA2 gene ประกอบด้วย forward primer A และ reverse primer A ให้ PCR product ขนาด 127 คู่เบส มี melting temperature 88 องศาเซลเซียส B-primer ใช้สำหรับตรวจพาหะ α^+-thalassemia ชนิด -$\alpha^{3.7}$ deletion สร้างขึ้นจาก DNA sequence ตรงด้าน 5' ของ HBA1 gene ประกอบด้วย forward primers B และ reverse primer B ให้ PCR product ขนาด 176 คู่เบส มี melting temperature 84.8 องศาเซลเซียส และ C-primer ใช้เป็น reference gene สร้างขึ้นจาก DNA sequence ตรงด้าน 3' ของ HBA1 gene ประกอบด้วย forward primers C และ reverse primer C ให้ PCR product ขนาด 176 คู่เบส มี melting temperature 84 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยา PCR ทำในเครื่อง Bio-Rad CFX96 real-time system แยกตรวจแบบแยกหลอดของ primers แต่ละคู่โดยทำสามซ้ำในแต่ละตัวอย่าง และต้องมี control normal DNA รวมอยู่ในการตรวจด้วยทุกครั้ง วิธีการตรวจวินิจฉัยได้จากการพิจารณาการวิเคราะห์ปริมานสัดส่วนของยีนแต่ละชนิดโดยใช้วิธี relative gene quantification [Delta-Delta ($\Delta\Delta$) Ct method][13-15] โดยคำนวณจากค่า cycle threshold (Ct) และ melt peak ของแต่ละ primers (Figure 3) ตามวิธีการดังต่อไปนี้ นำค่า Ct ของตัวอย่างศึกษามาคำนวณหาค่าสัดส่วน R (Ratio) (Table 2) โดยเปรียบเทียบ C-กับ A-primer (R_{C-A}) และ C-กับ B-primer (R_{C-B}) และ

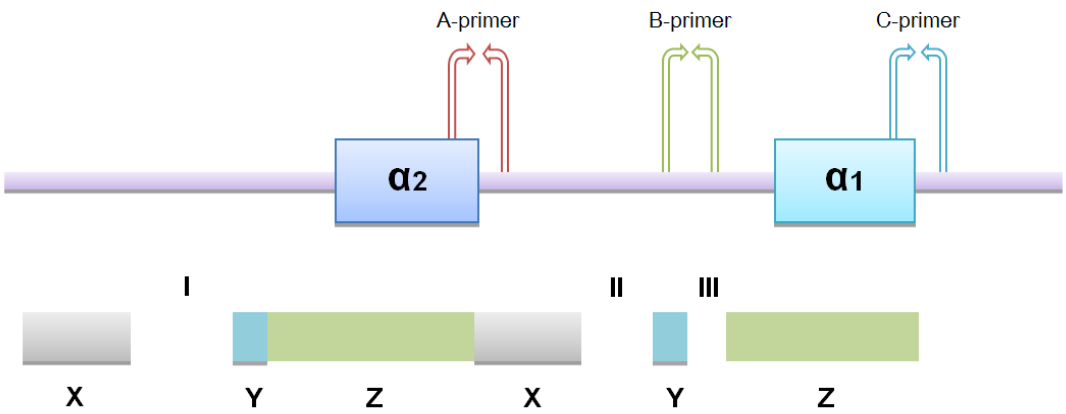


Figure 2 Schematic representing the position of three pairs of primer sets (A-, B- and C-primer). The duplication units are divided into three homologous sub-segments (X, Y, and Z boxes) with regions of non-homologous elements (I, II, III)[17-18].

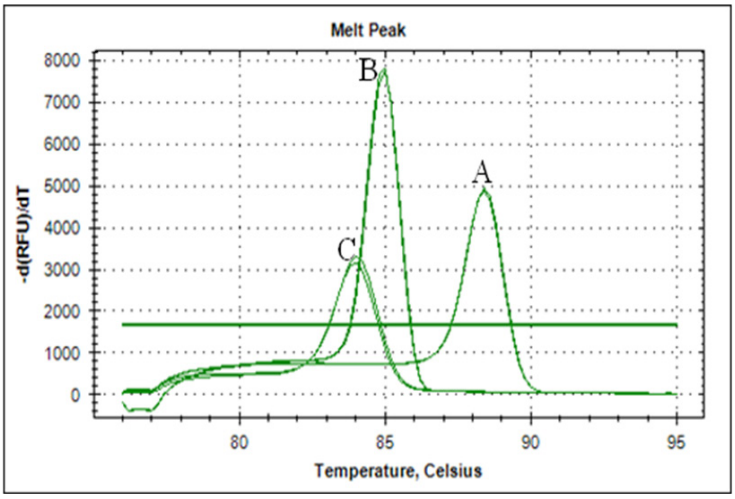


Figure 3 The melt peaks of A-, B- and C-primer which indicate the existence of PCR products. The monoplex qPCR of each A-, B- and C-primer created specific melting temperature at 88.0, 84.8 and 84.0°C, respectively.

Table 2 The samples of the Relative gene amplification ratio (R) calculation [$R = 2^{-DDCt}$]

Sample	Ct_A	Ct_C	$DCt_{(C-A)}$	$DDCt_{(C-A)}$	$R_{(C-A)}$
Unknown 1	30.67	30.27	-0.40	1.06	0.48
Unknown 2	29.84	30.41	0.75	0.09	0.94
Unknown 3	31.12	30.77	-0.35	1.01	0.50
Normal	30.00	30.66	0.66	-	-

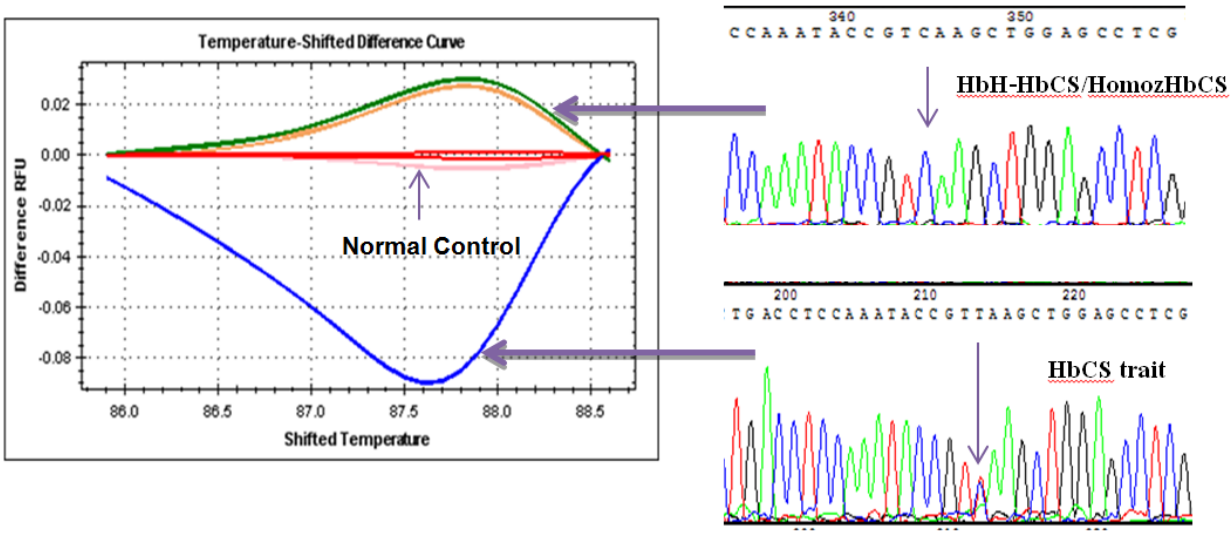


Figure 4 High-resolution melting analysis of the A-primer to determine the Hb CS genotype. Samples were from the DNA of the individual with HbH with Hb CS, Hb CS trait and normal control. The Hb CS carriers were back up by direct DNA sequencing.

เทียบกับของคนปกติ คำนวณได้จากจากสมการ $R = 2^{-DDCt}$ ผล R_A และ R_B มีค่าประมาณ 0.5 ทั้งคู่ แสดงว่าตัวอย่างนั้น เป็นพาหะ α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{3.7}$ deletion หาก R_A มีค่าประมาณ 0.5 และ R_B มีค่าประมาณ 1.0 แสดงว่าตัวอย่างนั้น เป็นพาหะของชนิด $-\alpha^{4.2}$ deletion และหาก R_A และ R_B มีค่าประมาณ 1.0 ทั้งคู่ แสดงว่าตัวอย่างนั้นไม่มีการขาดหายไปของ α-globin gene แต่ในบริเวณส่วนของ A-primer ยังอาจเป็น Hb CS ได้

การตรวจ Hb CS ด้วยวิธี HRM analysis โดยการวิเคราะห์ชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้จาก A-primer ของแต่ละตัวอย่างเทียบกับ control DNA ในการตรวจตัวอย่างด้วย real-time PCR แต่ละครั้ง มีการตั้งโปรแกรมเพื่อใช้ในการทำ HRM analysis โดยเริ่มจากการให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที melting cycle เริ่มใหม่ที่อุณหภูมิ 76-95 องศาเซลเซียส โดยค่อยๆ เพิ่มความร้อนขึ้นในอัตรา 0.2 องศาเซลเซียสต่อ 10 วินาที จนกว่า double strand DNA จะแยกสายออกเป็น single strand DNA สี fluorescence ที่เปลี่ยนไปจะถูกบันทึกเป็น melt curve ที่เรียกว่า temperature-shift different curve และให้ภาพจำเพาะสำหรับพาหะ Hb CS (Figure 4)

Thalassemia counseling แจ้งผลในทางลับให้อาสาสมัครทุกรายทราบ อาสาสมัครที่มีผลเป็นพาหะของ α-thalassemia gene ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่เป็นพาหะของ α^0-thalassemia gene และกลุ่มที่เป็นพาหะของ α^+-thalassemia gene จัดสัมมนาให้ความรู้เพื่อให้ตระหนักถึงภัย การเกิดโรค การถ่ายทอดของ thalassemia gene และวิธีป้องกันแก่อาสาสมัครทราบ[16]

การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยพะเยา

ผลการศึกษา

การตรวจ α-thalassemia gene จากเลือดตัวอย่างของบุคลากร มหาวิทยาลัยพะเยา 123 ราย พบมีผู้เป็น พาหะของ α^0-thalassemia gene ชนิด $--^{SEA}$ deletion ทั้งหมด 16 ราย โดยพบชนิด $--^{Thai}$ deletion จำนวน 1 ราย สำหรับพาหะของ α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{3.7}$ deletion พบ 18 ราย พาหะของ α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{4.2}$ deletion พบ 2 ราย พาหะ

Table 3 Thalassemia genotypes

Genotypes	Number	Percentage (%)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	73	59
$--^{SEA}/\alpha\alpha$	16	13
$--^{Thai}/\alpha\alpha$	1	0.8
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	18	15
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	2	1.6
$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	6	5
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	2	2.4
$--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$	3	2.4
$-\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$	2	1.6
Total	**123**	**100**

Hb CS มี 6 ราย homozygous $-\alpha^{3.7}$ deletion พบ 3 ราย compound heterozygous $-\alpha^{3.7}$/Hb CS พบ 2 ราย และพบ HbH disease (compound heterozygous ระหว่าง α^0- และ α^+-thalassemia gene ชนิด $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$ จำนวน 3 ราย (Table 3) รวมทั้งหมดที่มี α-thalassemia gene เท่ากับ 50 ราย (ร้อยละ 41) ผลการตรวจพาหะ α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{3.7}$ และ $-\alpha^{4.2}$ deletion ให้ผลสอดคล้องกับวิธี conventional Gap-PCR (Figure 5)

เมื่อจัดให้มีการให้คำแนะนำ thalassemia counseling กับผู้เป็นพาหะของ α^0-thalassemia gene (16 ราย) และผู้เป็นพาหะ α^+-thalassemia gene (34 ราย) เพิ่มเติมแล้ว พบว่าอาสาสมัครมีความเข้าใจการป้องกันการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียเป็นอย่างดี

วิจารณ์

ผลจากการศึกษาพบ α^0-thalassemia และ α^+-thalassemia gene ของอาสาสมัครในอัตราที่สูง อาสาสมัครเหล่านี้เป็นคนไทยในเขตภาคเหนือตอนบนและเกือบทั้งหมดเป็นผู้ที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดพะเยา ผู้ที่เป็นพาหะ α^+-thalassemia ไม่สามารถตรวจคัดกรองได้ด้วยดูค่า MCV หรือวิธี OF ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ DNA ในการตรวจวินิจฉัย α^+-thalassemiaโดยความหลากหลายของชนิด α-thalassemia ในอาสาสมัครพบได้ทุกชนิด เหมือนที่พบในภาคอื่นๆ ของประเทศ อาทิ α^0-thalassemia gene ชนิด $--^{SEA}$ และ $--^{Thai}$ deletions สำหรับ α^+-thalassemia พบชนิด $-\alpha^{3.7}$ deletion ชนิด $-\alpha^{4.2}$ deletion และ non-deletion α^+-thalassemia ชนิด Hb CS โดยพบว่ามีความชุกของ α-thalassemia gene โดยรวมแล้วสูงถึงร้อยละ 40 จำแนกได้เป็น α^0-thalassemia gene ชนิด $--^{SEA}$ deletion พบร้อยละ 13 ชนิด $--^{Thai}$ deletion พบร้อยละ 0.8 ส่วน α^+-thalassemia ชนิด $-\alpha^{3.7}$ deletion พบร้อยละ 15 ชนิด $-\alpha^{4.2}$ deletion พบร้อยละ 1.6 และร้อยละ 5 ของ non-deletion α^+-thalassemia ชนิด Hb CS ซึ่งเมื่อรวมพาหะของทั้ง α^0-halassemia และ α^+-thalassemia มีความชุกเท่ากับ ร้อยละ 41 ซึ่งสูงที่สุดเท่าที่เคยมีรายงาน นอกจากนี้การตรวจพบ HbH disease ถึง 4 ราย โดย 3 ราย เป็น HbH ชนิด α^0-thalassemia ($--^{SEA}$)/α^+-thalassemia ($-\alpha^{3.7}$) และอีก 1 ราย เป็นชนิด α^0-thalassemia ($--^{SEA}$)/ non deletion α^+-thalassemia Hb CS เมื่อคำนวณเป็นความถี่ของยีนแต่ละชนิดพบว่า α^0-thalassemia มีความถี่ของยีนเท่ากับ 0.081

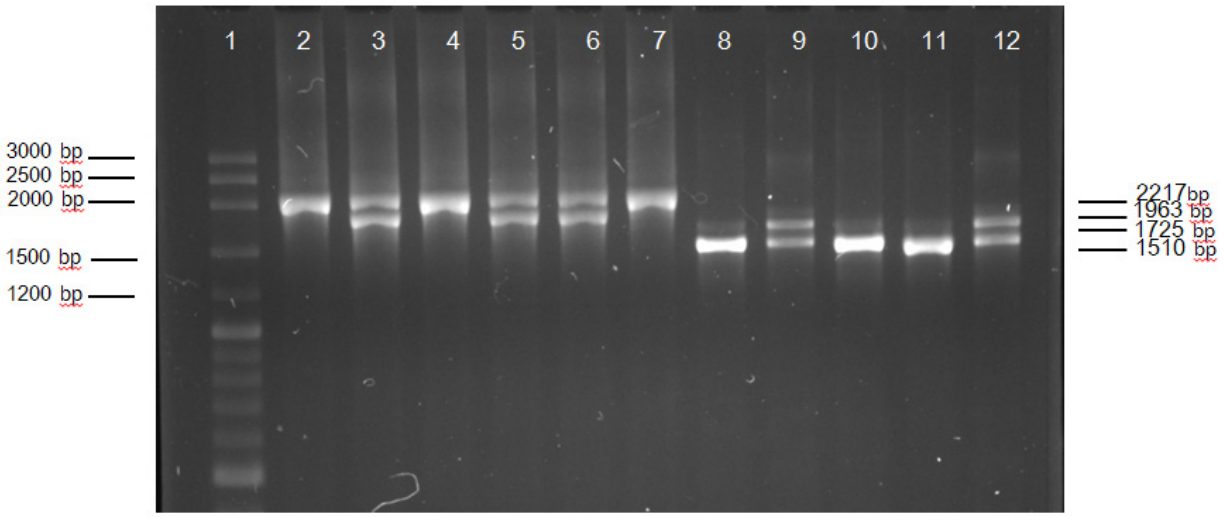


Figure 5 Gel electrophoresis of amplified DNA of deletional α^+-thalassemia. The samples are as follows: lane 1,VC 100 bp Plus DNA Ladder Vivantis; lanes 2, $-\alpha^{3.7}$ normal control; lane 3, $-\alpha^{3.7}$ positive control; lanes 4 and 7, $-\alpha^{3.7}$ normal samples; lanes 5 and 6, $-\alpha^{3.7}$ trait; lane 8, $-\alpha^{4.2}$ normal control; lane 9, $-\alpha^{4.2}$ positive control; lanes 10 and 11, $-\alpha^{4.2}$ normal samples; lane 12, $-\alpha^{4.2}$ trait.

และ α^+-thalassemia มีความถี่ของยีนเท่ากับ 0.126 และ Hb CS มีความถี่ของยีนเท่ากับ 0.033 เมื่อคำนวณตามทฤษฎีของ Hardy-Weinberg พบว่า คู่สมรส 1,000 คู่อาจให้บุตรเป็นโรค homozygous α^0-thalassemia เป็นจำนวนถึง 7 ราย HbH disease (α^0-thalassemia/α^+-thalassemia deletions) จำนวน 20 ราย และ HbH/Hb CS disease (α^0-thalassemia/Hb CS) จำนวน 5 ราย

สรุป

ผลการศึกษาทำให้พออนุมานได้ว่าความชุกของ α^0-thalassemia และ α^+-thalassemia และ Hb CS มีความชุกสูงในกลุ่มอาสาสมัครบุคลากร มหาวิทยาลัยพะเยา และการให้ thalassemia counseling สามารถทำให้ผู้ที่มียีนแฝงเข้าใจถึงความสำคัญและวางแผนครอบครัวที่เหมาะสมได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณท่านอธิการบดี ศาสตราจารย์ (พิเศษ) ดร. มณฑล สงวนเสริมศรีที่สนับสนุนให้การดำเนิน โครงการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. *Lemmens-Zygulska M, Eigel A, Helbig B, Sanguansermsri T, Horst J, Flatz G. Prevalence of alpha-thalassemias in northern Thailand. Hum Genet 1996;98:345-7.*
2. *Hundrieser J, Sanguansermsri T, Papp T, FlatzG. Alpha-Thalassemia in Northern Thailand. Hum Hered 1988;38:211-5.*
3. *Tongsong T, Chanprapaph P, Wanapirak C, Sirichotiyakul S. Intrauterine intravenous transfusion therapy for hydrops fetalis due to anemia of uncertain causes. Int J Gynaecol Obstet 2006;94:128-30.*
4. *Charoenkwan P, Taweephon R, Sae-Tung R, Thanarattanakorn P, Sanguansermsri T. Molecular and clinical features of Hb H disease in northern Thailand. Hemoglobin 2005;29:133-40.*
5. *Laosombat V, Viprakasit V, Chotsampancharoen T, et al. Clinical features and molecular analysis in Thai patients with HbH disease. Ann Hematol 2009;88:1185-92.*
6. *Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009;26-34.*
7. *Chui DH, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Blood 2003;101:791-800.*
8. *Pornprasert S, Phusua A, Santa S, Saetung R, Sanguansermsri T. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green 1 and high resolution melting analysis. Eur J Haematol 2008;80:510-4.*
9. *Sirichotiyakul S, Wanapirak C, Saetung R, Sanguansermsri T. High resolution DNA melting analysis: an application for prenatal control of alpha-thalassemia. PrenatDiagn 2010;30:348-51.*
10. *Seeratanachot T, Sanguansermsri T, Shimbhu D. Analysis of Hb H disease genotypes common in northern Thailand by quantitative real-time PCR and high resolution melting analysis. Hemoglobin 2013;37:574-83.*
11. *Liu YT, Old JM, Miles K, Fisher CA, Weather DJ, Clegg JB. Rapid detection of α-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. Br J Heamatol 2000;108:295-9.*
12. *Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguansermsri T. Analysis of beta-thalassemia mutations in northern Thailand using an automated fluorescence DNA sequencing technique. Hemoglobin 2003;27:89-95.*
13. *Michael WP. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res2001;29:2003-7.*
14. *Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) Method. Methods2001;25:402-8.*
15. *Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc 2008;3:1101-8.*
16. *Prevention of thalassemias and other haemoglobin disorders. Thalassemia International Federation 2003;1.*
17. *Higgs DR, Thein SL, Wood WG. Thalassaemia: classification, genetics and relationship to other inherited disorders of hemoglobin. In: Weatherall DJ, Clegg JB, eds. The Thalassaemia Syndromes. 4th ed. Oxford, London: Blackwell Science 2001:121-32.*
18. *Higgs DR, Hill AV, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB. Independent recombination events between the duplicated human alpha globin genes; implications for their concerted evolution. Nucleic Acids Res 1984;12:6965-77.*

Prevalence of Alpha-thalassemia Trait in the Volunteered Personals of University of Phayao

Narutchala Suwannakhon[1], Teerapat Seeratanachot[2], Khwanruedee Mahingsa[3], Pratompong Namwong[3] and Torpong Sanguansermsri[3]

[1]Discipline of Biology, School of Science; [2]Discipline of Biochemistry, School of Medical Sciences; [3]Thalassemia Unit, Institute of Human Genetics, University of Phayao, Phayao

Abstract

Rationale: *Alpha (α) -thalassemia is a common hereditary hematological disease in northern Thailand. There are many different genotypes. Affected fetus with hydrops fetalis syndrome almost always succumbs in the uterus. Premarital α-thalassemia trait identification may help to provide the carrier individual a future appropriate family planning.* ***Objectives:*** *The propose study aimed to access prevalence of α-thalassemia genotype among the volunteered personals who were all in reproductive age of the University of Phayao.* ***Materials and Methods:*** *One hundred twenty three DNA samples were undergone molecular characterization for α-thalassemia mutation. Quantitative real-time PCR (q-PCR) with SYTO9 was applied for the detection of α^0-thalassemia Southeast Asian $--^{SEA}$ deletion and α^0-thalassemia Thai $--^{Thai}$ deletion. The relative gene quantification assay was for the characterization of $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ deletions whereas high resolution DNA melting (HRM) analysis was for the detection of hemoglobin Constant Spring (Hb CS, HBA2 codon142 TAA-CAA). In addition, the individual volunteer has been notified the diagnosed results by the memorandum. The α-thalassemia traits have been provided the genetic counseling.* ***Results:*** *Of the 123 volunteers, 16 cases were the α^0-thalassemia $--^{SEA}$ deletions (13%) and one was α^0-thalassemia $--^{Thai}$ deletions (0.8%). Eighteen cases were the $-\alpha^{3.7}$ deletion (15%) while two cases were $-\alpha^{4.2}$ deletion (1.6%). The non-deletion α^+-thalassemia; Hb CS was 6 cases (5%). Three cases showed the presence of homozygous $-\alpha^{3.7}$ deletions (2.4%). The heterozygous $-\alpha^{3.7}$ deletion/Hb CS was detected in 2 cases (1.6%). HbH disease [α^0- thalassemia ($--^{SEA}$)/$\alpha^+(-\alpha^{3.7})$] was 3 cases (2.4%). The calculated gene frequency of α^0-, α^+-thalassemia and Hb CS were 0.081, 0.126 and 0.033 respectively. Additionally, the counseled thalassemia traits have more understanding the thalassemia prevention.* ***Conclusions:*** *The results of the study indicated that there were an unusually high prevalence of α^0- and α^+-thalassemia trait among the volunteering population. According to Hardy-Weinberg's law 7 of homozygous α^0-thalassemia, 20 cases of HbH diseases and 5 cases of HbH/Hb CS disease will be born of one thousand pregnancies. It is therefore α-thalassemia test is thus necessary in order that the counseled individual of α-thalassemia trait will be able to manage his family planning properly.*

Keywords : ● *Prevalence* ● *Alpha thalassemia trait* ● *Reproductive age personals* ● *University of Phayao*

J Hematol Transfus Med 2014;24:129-36.