นิพนธ์ต้นฉบับ

การประยุกต์ใช้เทคนิคแอลลีลสเปซิฟิกพีซีอาร์เพื่อศึกษาทางระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินปากเซในจังหวัดนครศรีธรรมราช

สิทธิชัย ปัญญาใส, วราวุฒิ เลาเลิศ*, วรุณพร พิมพ์ศรี*, และ ลาวัณย์ คงสตรี

แขนงวิชาโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา
**นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์*

บทคัดย่อ : *ฮีโมโกลบินปากเซ (Hb Pakse') เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนยุติของยีน α_2-globin (TAA-TAT) เป็นผลให้เกิดการสังเคราะห์สายโกลบินที่ยาวผิดปกติคล้ายกับฮีโมโกลบินคอนสแตนท์-สปริง (Hb CS; TAA-CAA) จัดเป็น nondeletional α-thalassemia 2 ชนิดหนึ่ง เมื่อพบร่วมกับ α-thalassemia 1 ทำให้เกิดโรค Hb H ที่มีอาการรุนแรงได้และรุนแรงมากกว่าชนิดที่เกิดจาก deletional α-thalassemia 2 ร่วมกับ α-thalassemia 1 ในปัจจุบันมีรายงานพบว่ามี Hb Pakse'ในประชากรลาว, ไทยและกัมพูชาแล้วโดยใช้เทคนิค Allele Specific-PCR แต่ยังไม่มีการศึกษาข้อมูลด้านระบาดวิทยาในประชากรไทย ในรายงานนี้จึงได้ศึกษายีน Hb Pakse' ในหญิงตั้งครรภ์ในจังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 448 รายโดยใช้วิธี ASPCR และได้ตรวจพบว่ามี Hb Pakse' 2 ราย (ร้อยละ 0.4) ซึ่งเป็น Hb Pakse' heterozygote มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น A_2A และยังได้พบว่าข้อมูลทางโลหิตวิทยาใน 2 รายนี้ไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปจากคนปกติ ข้อมูลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีระบาดวิทยาของ Hb Pakse' ในภาคใต้ของประเทศไทย จำเป็นที่จะต้องตระหนักถึงความสำคัญเพื่อการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในภูมิภาคนี้ นอกจากนี้ไม่สามารถให้การวินิจฉัยความผิดปกติของฮีโมโกลบินชนิดปากเซได้จากการตรวจเลือดเพียงอย่างเดียวจำเป็นต้องอาศัยการตรวจดีเอ็นเอร่วมด้วย*

Key Words : *● Hb Pakse' ● Nondeletional α-thalassemia 2 ● Hb H disease ● Allele Specific-PCR*
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2551;18:42-51.

ปัจจุบันมีรายงานพบฮีโมโกลบินผิดปกติมากกว่า 750 ชนิดแล้วทั่วโลก ซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์แบบเฉพาะจุด (point mutation) ชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทยมี 2 ชนิดคือ ฮีโมโกลบินอี (HbE) เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 26 ของยีน α-globin (*G*AG --> *A*AG ; Term --> Lys) จัดเป็น β^+-thalassemia ชนิดหนึ่ง เมื่อพบร่วมกับ β-thalassemia สามารถก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการตั้งแต่รุนแรงน้อยไปจนถึงรุนแรงมากได้ และฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง (Hb Constant Spring ; HbCS) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนยุติของ α_2-

ได้รับต้นฉบับ 5 ตุลาคม 2550 ให้ลงตีพิมพ์ 13 กุมภาพันธ์ 2551
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นายสิทธิชัย ปัญญาใส แขนงวิชาโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา เลขที่ 19 หมู่ 2 ถนนลำปาง-พะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

globin gene (*TAA* --> *CAA* ; Term --> Gln) จัดเป็น α-thalassemia 2 ชนิดหนึ่งเนื่องจากการกลายพันธุ์ที่โคดอนยุติของ α_2-globin gene เป็นผลให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่ยาวกว่าปกติไปอีก 31 ตัว เมื่อพบร่วมกับ α-thalassemia 1 ทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเฮท (Hb H disease) ที่มีอาการรุนแรงได้[1,2] ระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 2 ชนิดในประเทศไทยมีรายงานไว้แล้วคือประชากรโดยรวมทั้งประเทศเป็นพาหะฮีโมโกลบินอีประมาณร้อยละ 13 แต่ในบางพื้นที่ของประเทศโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากถึงร้อยละ 53 พาหะฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงพบประมาณร้อยละ 1-8[3] นอกจากนี้เมื่อปี ค.ศ. 1990 มีรายงานฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่งซึ่งมีการเคลื่อนที่ในตำแหน่งเดียวกันกับฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงที่สังเกตได้จากการทำ electrophoresis แต่ในขณะนั้นยังไม่มีการศึกษาถึงระดับโมเลกุล[4] และต่อมามีการพบลักษณะดังกล่าวในเด็กหญิงอายุ 11 ปี ซึ่งป่วยเป็นโรค Hb H มีบ้านเกิดอยู่ที่แขวงปากเซ ประเทศลาว เมื่อมีการศึกษาในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิค DNA sequencing แล้วพบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนยุติของ α_2-globin gene (TA*A* --> TA*T*; Term --> Tyr) เป็นผลให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่ยาวออกไปอีก 31 ตัว คล้ายกับฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง และเรียกชื่อตามภูมิลำเนาของผู้ป่วยคือ ฮีโมโกลบินปากเซ (Hb Pakse') นับเป็นการรายงานครั้งแรก[5] และต่อมาตรวจพบว่ามี Hb Pakse' ในประชากรไทยและเขมรด้วย[6,7] ซึ่งเป็นข้อมูลที่สนับสนุนว่าน่าจะพบได้ทั่วไปในเอเชียอาคเนย์ ซึ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาทางด้านระบาดวิทยาต่อไป แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานทางระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินปากเซในภูมิภาคนี้ การเกิดพยาธิสภาพของฮีโมโกลบินปากเซ คล้ายคลึงกับฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง คือ เมื่อพบร่วมกับ α-thalassemia 1 ทำให้เกิดโรค Hb H ที่มีอาการรุนแรงได้ และไม่พบว่ามีอาการทางคลินิกที่รุนแรงมากกว่าโรค Hb H ที่เกิดจากฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงร่วมกับ α-thalassemia 1[8] นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า โรค Hb H ที่เกิดจากฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงหรือฮีโมโกลบินปากเซ ร่วมกับ α-thalassemia 1 มีอาการรุนแรงมากกว่าโรค Hb H ที่เกิดจาก α-thalassemia 1 ร่วมกับ α-thalassemia 2 ชนิด gene deletion เช่น $\alpha^{3.7}$ หรือ $\alpha^{4.2}$ เป็นต้น[2,9,10] นอกจากฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 2 ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนยุติของยีน α_2-globin แล้วยังมีรายงานพบฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งเดียวกันอีกหลายชนิด เช่น Hb Icaria (*T*AA --> *A*AA), Hb Koya Dora (TAA --> TCA), Hb Seal Rock (TAA --> GAA)[11] แต่ยังไม่มีรายงานว่าพบในประชากรไทย จากข้อมูลความชุกของ α-thalassemia ในประเทศไทยประมาณการจากจำนวนประชากรทั้งประเทศกว่า 62 ล้านคน พบว่าในแต่ละปีจะมีทารกเกิดใหม่ป่วยเป็นโรค Hb H ประมาณ 7,000 คนและปัจจุบันมีผู้ป่วยโรค Hb H ทั้งประเทศกว่า 420,000 คน นับว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ นอกจากนี้ประมาณร้อยละ 17 ของจำนวนผู้ป่วยโรค Hb H ทั้งหมดเป็นชนิด nondeletional Hb H disease (--$\alpha^{CS}\alpha$ or --/$\alpha^{PS}\alpha$) ซึ่งมีอาการที่รุนแรงบางรายต้องได้รับการตัดม้าม และ ได้รับเลือดเป็นประจำ[9,12] ข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมา[5] แสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงและฮีโมโกลบินปากเซไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้จากการตรวจเลือดเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้การแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธี electrophoresis ก็ไม่สามารถวินิจฉัยแยกฮีโมโกลบินทั้ง 2 ชนิดนี้ได้เนื่องจากมีการเคลื่อนที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโดยอาศัยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นหลักหลายวิธีเช่น Southern blot and Oligonucleotide hybridization, Mismatched-polymerase chain reaction fragment length polymorphism (mismatched-PCR-RFLP), Allele Specific-PCR (ASPCR), single-tube polymerase chain reaction-

single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP), DNA sequencing เป็นต้น[5,7,8,13] ซึ่งสามารถให้การวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง ในการศึกษานี้ได้ใช้เทคนิค Allele Specific-PCR; ASPCR ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นโดย Sanchaisuriya K และคณะ[7] ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินปากเซในจังหวัดนครศรีธรรมราช เนื่องจากทำได้ง่าย วิธีการทำไม่ซับซ้อนมากนัก และปฏิกิริยาในการตรวจวิเคราะห์ไม่ถูกรบกวนจากฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินปากเซ ในภาคใต้ของประเทศไทย อันจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการควบคุมและป้องกันโรคฮีโมโกลบินผิดปกติในภูมิภาคนี้

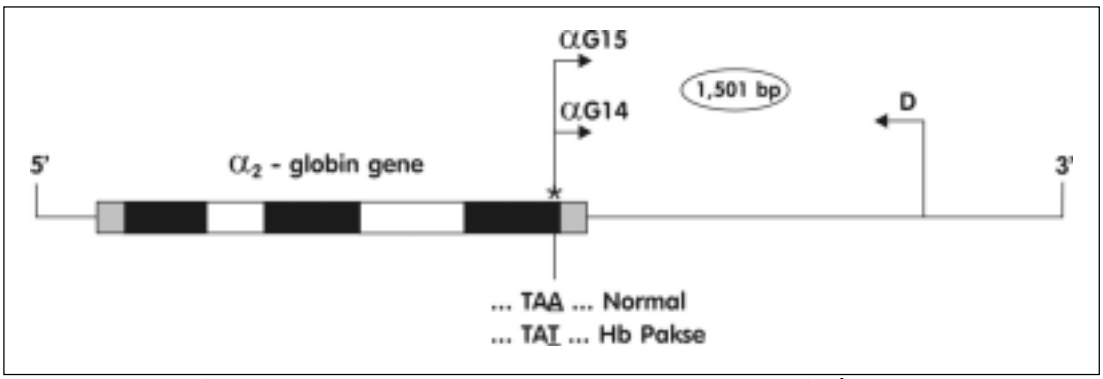
วัสดุและวิธีการ

การวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาและการตรวจแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

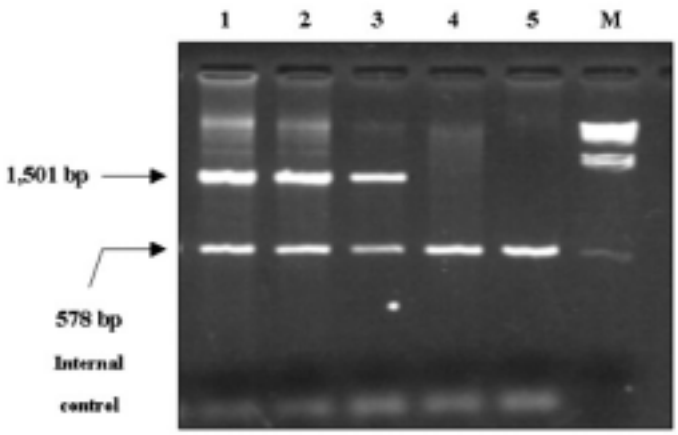
การศึกษานี้ทำการศึกษาในหญิงตั้งครรภ์จำนวน 448 ราย ทุกรายไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดและมีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดนครศรีธรรมราชทั้งหมด โดยใช้ตัวอย่างเลือดรวมที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการประจำวันจากโรงพยาบาลท่าศาลา อ.ท่าศาลา (270 ราย), โรงพยาบาลพรหมคีรี อ.พรหมคีรี (36 ราย) และ โรงพยาบาลสิชล อ.สิชล (142 ราย) จ.นครศรีธรรมราช ทำการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ประกอบด้วย RBC count, hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) และ red cell distribution width (RDW-CV) ด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (MEK-8222, NIHON KOHDEN, Tokyo, Japan) ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเจาะเก็บเลือด จากนั้นตัวอย่างทุกรายจะถูกนำมาวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี Cellulose acetate electrophoresis ในสภาวะด่างและ DE-52 minicolumn chromatography ตามลำดับ ณ ห้องปฏิบัติการวิจัย มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

การตรวจวิเคราะห์ยีนฮีโมโกลบินปากเซด้วยเทคนิค Allele Specific-PCR

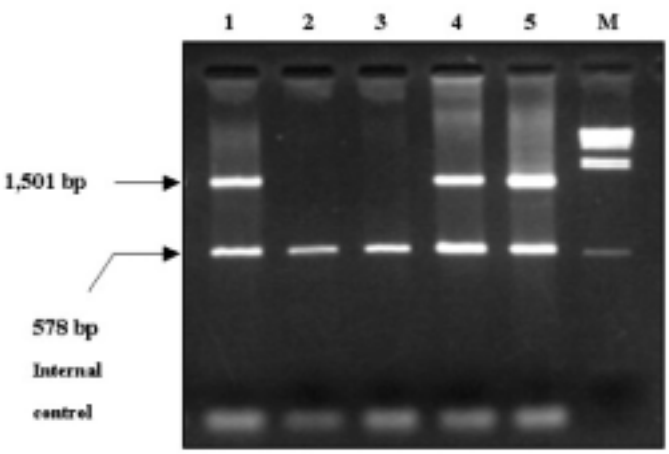
ตัวอย่างเลือดทุกรายจะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีมาตรฐานพร้อมทั้งตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทุกรายจะถูกตรวจวิเคราะห์ยีนฮีโมโกลบินปากเซด้วยเทคนิค Allele Specific-PCR[7] โดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นบริเวณที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแอลลีลของฮีโมโกลบินปากเซ αG14 (5'-GCTGACCTCCAAATACCGTTAT-3') (mutant primer) คู่กับ ไพรเมอร์ D (5'-TTCTGACTCTG CCCACAGCCTGA-3') (common primer) จะได้ดีเอ็นเอขนาด 1,501 bp สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเทคนิคดังกล่าวทุกราย จะถูกนำไปศึกษา Heterozygosity และ Homozygosity ของฮีโมโกลบินปากเซ โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแอลลีลปกติ ?G15 (5'-GCTGACCTCCAAATACCGTTAA-3') (normal primer) คู่กับ ไพรเมอร์ D จะได้ดีเอ็นเอขนาด 1,501 bp ตำแหน่งและทิศทางของไพรเมอร์แสดงในรูปที่ 1 นอกจากนี้ยังใช้ไพรเมอร์ $\gamma^{A}+\gamma^{G}$ ขยายดีเอ็นเอบริเวณโปรเมอร์ของยีน $^{G}\gamma$-globin สำหรับใช้เป็น internal control เพื่อควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ในการทำปฏิกิริยา PCR ทุกครั้ง ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอขนาด 578 bp ปฏิกิริยาและสภาวะในการทำ PCR ดังรายละเอียดในการศึกษาของ Sanchaisuriya K และคณะ เทคนิคดังกล่าวนี้ได้ถูกประเมินประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับเทคนิค DNA sequencing แล้วพบว่ามีความถูกต้องในการวินิจฉัยและเชื่อถือได้ร้อยละ 100[7]



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งและทิศทางของไพรเมอร์ของเทคนิค Allele Specific-PCR เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัย Hb Pakse' โดยไพรเมอร์ αG14 จำเพาะต่อแอลลีลที่มีการกลายพันธุ์ที่โคดอนยุติ (TAT) และไพรเมอร์ αG15 จำเพาะต่อแอลลีลที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่โคดอนยุติ (TAA)[7]



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจแอลลีลฮีโมโกลบินปากเซ (αG14 + D) ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้คือ 1,501 bp. M;λ/Hind III size markers, Lane 3 : Hb Pakse' control ($\alpha^{PS}\alpha$), Lane 4 : Normal control (αα), Lane 1, 2 :Hb Pakse' positive, Lane 5 : Hb Pakse' negative



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจแอลลีลปกติ (αG15 + D) ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ Hb Pakse' (αG14 + D) M ; α/Hind III size markers, Lane 1 : Normal allele control (αα/αα Lane 2 : Homozygous Hb Pakse' control ($\alpha^{PS}\alpha/\alpha^{PS}\alpha$), Lane 3 : Homozygous Hb Pakse' ($\alpha^{PS}\alpha/\alpha^{PS}\alpha$), Lane 4,5 : Heterozygous Hb Pakse'($\alpha\alpha/\alpha^{PS}\alpha$)

ผลการวิจัย

หญิงตั้งครรภ์จำนวน 448 รายที่นำมาศึกษา มีอายุเฉลี่ย 26±6.7 ปี (13-45 ปี) ทุกรายมีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดนครศรีธรรมราชทั้งหมดและไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือด ผลการตรวจหาชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธี electrophoresis พบว่าไม่พบตัวอย่างที่มีชนิดฮีโมโกลบินเป็นฮีโมโกลบินปากเซ และ/หรือ ฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง แต่พบเป็นชนิด A_2A จำนวน 391 ราย (ร้อยละ 87.3), EA จำนวน 54 ราย (ร้อยละ 12.1), EE จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 0.4) และ A_2FA จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.2) ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์ยีน Hb Pakse' ด้วยเทคนิค ASPCR พบว่ามีหญิงตั้งครรภ์จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 0.4) มียีน Hb Pakse' เป็นชนิด Heterozygote ($\alpha\alpha/\alpha^{PS}\alpha$) หรือ พาหะ Hb Pakse' เมื่อคำนวณความถี่ของยีนจากจำนวนโครโมโซมที่วิเคราะห์ทั้งหมด 896 โครโมโซม มีความถี่ของยีนเท่ากับ 0.002 หรือ ร้อยละ 0.22

ข้อมูลทางโลหิตวิทยา, ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง, ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน A_2 ในตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์ที่มียีน Hb Pakse' ทั้ง 2 ราย แสดงไว้ในตารางที่ 2 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของหญิงตั้งครรภ์ปกติ[14] ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะคล้ายกัน พบว่าข้อมูลดังกล่าวทั้งหมดมีลักษณะใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ผลการตรวจคัดกรองด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป one tube osmotic fragility test (OF-test) และ Dichlorophenolindophenol precipitation test (DCIP test) ในตัวอย่างทั้ง 2 ราย ให้ผลลบต่อการทดสอบ เหมือนกับกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ปกติ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

นอกจากฮีโมโกลบินอีและฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้บ่อยในประเทศไทยแล้ว ในปัจจุบันยังพบว่ามีฮีโมโกลบินปากเซ ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติอีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานพบในประชากรไทยด้วย แต่เนื่องจากเพิ่งมีรายงานการตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดนี้ได้ไม่นานและมีข้อจำกัดในการวินิจฉัยอยู่มาก จึงทำให้มีข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาในประชากรไทยน้อย การศึกษาในครั้งนี้ได้นำเทคนิค Allele Specific-PCR ซึ่งเคยถูกนำมาใช้เพื่อวินิจฉัยฮีโมโกลบินปากเซมาก่อน และมีประสิทธิภาพใน

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางโลหิตวิทยา, ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง, ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ในหญิงตั้งครรภ์จำนวน 448 ราย แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน)

Hematologic parameters	Hb types			
	A_2A(391)	EA(54)	EE(2)	A_2FA(1)
RBC (x10^6 cell/μL)	4.8±0.48	4.4±0.5	4.3, 4.5	-*
Hb (g/dL)	11.7±1.4	11.6±1.2	9.5, 9.6	37.0
Hct (%)	36.0±4.1	36.0±3.1	35.0, 30.5	13.2
MCV (fl)	88.0±7.3	80.1±4.9	74.2, 68.2	86.0
MCH (pg)	28.1±3.1	25.5±2.1	21.1	-*
MCHC (g/dL)	31.5±1.4	31.5±1.3	31.5	-*
RDW-CV (%)	12.9±1.1	13.1±2.0	15.7	-*

หมายเหตุ -* คือไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 2 ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง, ชนิดฮีโมโกลบิน, ปริมาณฮีโมโกลบิน A_2, ผลการตรวจ OF/DCIP ในหญิงตั้งครรภ์จำนวน 2 รายที่ถูกตรวจพบว่าเป็นพาหะ Hb Pakse'

Hematologic parameters	Normal (range)	Hb Pakse'	
	Pregnant woman[13]	Pregnancy 1	Pregnancy 2
RBC ($x10^6$ cell/μL)	4.1±0.4	3.89	3.86
Hb (g/dL)	12.3±1.0	11.8	11.0
Hct (%)	36.4±3.0	37.9	35.6
MCV (fl)	88.7±4.3	97.4	92.2
MCH (pg)	30.1±1.7	30.3	28.5
MCHC (g/dL)	33.9±1.1	31.1	30.9
RDW-CV (%)	13.5±0.7	12.0	12.2
OF test	negative	negative	negative
DCIP test	negative	negative	negative
Hb typing	A_2A	A_2A	A_2A
% HbA_2/E	2.7±0.3	3.1	3.2

การตรวจวินิจฉัยที่เชื่อถือได้[6,7] มาใช้ในการตรวจยีนฮีโมโกลบินปากเซ ในจังหวัดนครศรีธรรมราชซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อศึกษาข้อมูลทางด้านระบาดวิทยา และยังไม่เคยมีการศึกษาในภูมิภาคนี้มาก่อน พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 0.4) มียีนฮีโมโกลบินปากเซ แสดงให้เห็นว่าในภาคใต้ของประเทศไทยมีระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินปากเซด้วย เป็นข้อมูลที่สนับสนุนว่าไม่เพียงแต่จะพบว่ามีในประชากรภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและกรุงเทพ เท่านั้น[15] อาจจะพบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย และไม่เพียงเท่านี้อาจจะพบได้ในหลายๆ ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ด้วย ดังที่เคยมีรายงานในประเทศลาวและกัมพูชามาแล้ว[5,6] แต่ยังไม่มีรายงานข้อมูลด้านระบาดวิทยาในประชากรลาว มีเพียงแต่ประเทศกัมพูชาที่มีรายงานร้อยละ 0.4 ของประชากรในแขวงเสียมเรียบ (Siem Reap)[6] แต่จากการศึกษาความชุกของฮีโมโกลบินปากเซในคนไทย ลาวและเขมรของ กุลนภา ฟู่เจริญ และคณะ[16] พบความชุกร้อยละ 2 ในคนไทยอีสานและเขมร แต่ไม่พบในคนไทยหลวงพระบาง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในคนไทยอาจจะมีความชุกของฮีโมโกลบินปากเซโดยรวมทั้งประเทศใกล้เคียงกับฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง[3] แต่ที่มีรายงานน้อยกว่าเป็นเพราะ ไม่สามารถแยกฮีโมโกลบินปากเซออกจากฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงได้ด้วยวิธีการตรวจเลือดตามปกติ (ตารางที่ 2) และนอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินปากเซน่าจะมีแหล่งกำเนิดอยู่ในบริเวณรอยต่อของประเทศไทย ลาว และกัมพูชา คล้ายกับฮีโมโกลบินอี[17] ห่างจากบริเวณนี้ออกไปจะพบฮีโมโกลบินปากเซได้ลดลง จากการศึกษานี้ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินปากเซที่พบน้อยกว่าในคนไทยอีสานอาจเป็นเพราะไม่ได้ทำการศึกษาในประชากรกลุ่มใหญ่ เป็นเพียงการศึกษาในหญิงตั้งครรภ์เท่านั้น เป็นผลให้ข้อมูลที่ได้ไม่แสดงถึงความชุกของฮีโมโกลบินปากเซในประชากร ดังนั้นควรต้องทำการศึกษาในกลุ่มประชากรทั่วไปเพื่อให้ได้ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาที่ถูกต้องในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนวิธีการดำเนินงานควบคุม

และป้องกันโรคในภูมิภาคนี้ได้อย่างเหมาะสม

ปัญหาและข้อจำกัดของการตรวจฮีโมโกลบินปากเซก่อนหน้านี้คือ ไม่สามารถตรวจคัดกรองได้ด้วยวิธี osmotic fragility test (OF-test) ซึ่งเป็นวิธีตามแนวทางการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียตามแผนงานการควบคุม และป้องกันโรคของประเทศไทย[18] นอกจากนี้ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ที่ได้จากเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติยังไม่สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์การคัดกรองได้ เนื่องจากค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงของผู้เป็นพาหะดังกล่าวไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปจากคนปกติดังข้อมูลในตารางที่ 2 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Sanchaisuriya K และคณะ[14] นอกจากนี้การศึกษา mRNA ของฮีโมโกลบินปากเซพบว่ามีความเสถียรน้อยมากทำให้พบปริมาณโปรตีนฮีโมโกลบินปากเซ ($\alpha_2^{PS}\beta_2$) ในกระแสเลือดน้อย[19] เป็นผลให้บางครั้งอาจจะตรวจไม่พบได้ด้วยวิธี electrophoresis ได้ และนอกจากนี้ยังมีการเคลื่อนที่ตรงตำแหน่งเดียวกันกับฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงอีกด้วยทำให้ถูกวินิจฉัยรวมเป็นฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงได้ ดังนั้นจำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลร่วมด้วย ถึงแม้ว่าการวินิจฉัยที่ผิดพลาดจากฮีโมโกลบินปากเซเป็นฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริง ก็ไม่ทำให้เป็นปัญหาในทางคลินิกและการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม เนื่องจากก่อให้เกิดโรคหรือพยาธิสภาพแล้วแสดงอาการทางคลินิกที่เหมือนกัน[8] แต่ส่งผลต่อข้อมูลทางด้านระบาดวิทยา โดยทำให้ความชุกของฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงและปากเซ สูงกว่าและน้อยกว่าความเป็นจริงตามลำดับ โดยมีการศึกษาพบฮีโมโกลบินปากเซประมาณร้อยละ 7-15 ในผู้ที่เคยถูกวินิจฉัยว่าเป็นฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงมาก่อนด้วยวิธี electrophoresis[7,9] ดังนั้นเป็นไปได้ว่าหากได้รับการวินิจฉัยอย่างถูกต้องแล้ว ในประเทศไทย ลาว กัมพูชา หรือประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อาจมีความชุกของฮีโมโกลบินปากเซสูงที่ต้องได้รับการควบคุมและป้องกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องได้รับการวินิจฉัยให้ถูกต้อง เทคนิค Allele Specific-PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ช่วยให้การตรวจวินิจฉัยฮีโมโกลบินปากเซได้อย่างถูกต้อง และเหมาะสมในการที่จะนำมาใช้ตรวจในประชากรขนาดใหญ่ เนื่องจากมีวิธีการที่ไม่ซับซ้อนและแปลผลได้ง่าย นอกจากนี้ยังให้ผลการตรวจที่เชื่อถือได้

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินปากเซในภาคใต้ของประเทศไทย จำเป็นที่จะต้องตระหนักถึงความสำคัญ เพื่อการควบคุมและป้องกันโรคฮีโมโกลบินผิดปกติในภูมิภาคนี้ และเทคนิค Allele Specific-PCR มีประสิทธิภาพต่อการตรวจวินิจฉัยฮีโมโกลบินปากเซและเหมาะที่จะนำไปใช้ศึกษาในประชากรจำนวนมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลท่าศาลา อ.ท่าศาลา โรงพยาบาลพรหมคีรี อ.พรหมคีรี และโรงพยาบาลสิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช ที่ช่วยกรุณาเก็บตัวอย่างเลือดและตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาและดัชนีเม็ดเลือดแดงให้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่สนับสนุนงบประมาณ, เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. *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.*
2. *Charoenkwan P, Sirichotiyakul S, Chanprapaph Ph, Tongprasert F, Taweephol R, Sae-Tung R, et al. Anemia and Hydrops in a Fetus With Homozygous Hemoglobin Constant Spring. J Pediatr Hematol Oncol 2006;28:827-30.*
3. *Svasti J, Srisomsap Ch, Winichagoon W, Fucharoen*

S. Detection and structural analysis of abnormal hemoglobins found in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1999;30(Suppl 2):88-93.

4. Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G, Sanguansermsri T, Das BM, et al. The distribution of Hb Constant Spring gene in Southeast Asian populations. Hum Genet 1990;84:188-90.
5. Waye JS, Eng B, Patterson M, Chui DHK, Olivieri NF. Identification of a Novel Termination Codon Mutation (TAA --> TAT, Term --> Tyr) in the α2-Globin Gene of a Laotian Girl with Hemoglobin H Disease. Blood 1994;83:3418-20.
6. Carley BP, Prior JF, Gilbert A, Lim E, Devenish R, Sing H, et al. The prevalence and molecular basis of hemoglobinopathies in Cambodia. Hemoglobin 2006; 30:463-70.
7. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Hb Pakse' [(a2) codon 142 (TAA --> TAT or Term --> Try)] in Thai patients with EABart's disease and Hb H disease. Hemoglobin 2002;26:227-35.
8. Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Pung-Amritt P, Petrarat S, Suwantol L, Fisher Ch. Clinical phenotypes and molecular characterization of Hb H-Pakse' disease. Haematologica 2002;87:117-25.
9. Chui DHK, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Blood 2003;101:791-800.
10. Boonsa S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Wiangnon S, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. The diversity molecular basis and hematological features of Hb H and AEBart's diseases in Northeast Thailand. Acta Haematol 2004;111:149-54.
11. Hong GR, Adams JG. Human Hemoglobin Genetics; Springer-Verlag; New York, NY, USA, 1985.
12. Aessopos A, Kati M, Meletis J. Thalassemia intermedia today: should patients regularly receive transfusions?. Transfusion 2007;47:792-800.
13. Turbpaiboon C, Siritantikorn A, Thongnoppakhun W, Bunditworapoom D, Limwongse C, Yenchitsomanus PT, et al. Hemoglobin Pakse: presence on red cell membrane and detection by polymerase chain reaction-single-strand conformational polymorphism. Int J Hematol 2004;80:136-9.
14. Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Ratanasiri T, Sanchaisuriya P, Fucharoen G, Dietz E, et al. Thalassemia and hemoglobinopathies rather than iron deficiency are major causes of pregnancy related anemia in northeast Thailand. Blood Cell Mol Dis 2006;37:8-11.
15. Singsanan S, Fucharoen G, Savongsy O, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Molecular characterization and origins of Hb Constant Spring and Hb Pakse' in Southeast Asian populations. Ann Hematol 2007;86: 665-9.
16. กุลนภา ฟู่เจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, นริศรา ชันแสง, อรอนงค์ พัวรัตนอรุณกร, สุพรรณ ฟู่เจริญ. ความชุกของฮีโมโกลบินปากเซในคนไทยอีสาน ลาวและเขมร. การประชุมสัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 9 โรงแรมเรดิสันกรุงเทพมหานคร 2546.
17. Fucharoen G, Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Sae-ung N, Suyasunanond U, Sriwilai P, et al. Frequency Distribution and Haplotype heterogeneity of β^E-globin gene among eight minority group of Northeast Thailand. Hum Here 2002;53:18-22.
18. สุพรรณ ฟู่เจริญ, กุลนภา ฟู่เจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรคของประเทศไทย. สงขลานครินทร์เวชสาร 2545;20:43-55.
19. Molchanova TP, Smetanina NS, Huisman TH. A second, elongated, alpha 2-globin mRNA is present in reticulocytes from normal persons and subjects with terminating codon or poly A mutations. Biochem Biophys Res Commun 1995;214:1184-90.

Application of An Allele Specific-PCR Technique in The Epidemiological Study of Hb Pakse' at Nakhon Si Thammarat, Thailand

Sitthichai Panyasai*, Warawut Laoleart, Waroonporn Pimsri, and Lawan Kongsatree

**Division of Hematology and Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Naresuan University Phayao; Medical Technology students, School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University*

Abstract : *Hb Pakse' is caused by an α_2-globin gene termination codon mutation, TAA --> TAT or Term --> Try leading to the elongated production of an α-globin chain known as Hb Pakse' quite similar to hemoglobin Constant Spring (TAA --> CAA or Term --> Gln). This mutation represents the form of nondeletional α-thalassemia 2. Co-inheritance of this mutation with α-thalassemia 1 leads to Hb H disease. In general, its clinical course more severe than the deletion form which is caused by a deletional α-thalassemia 2 with α-thalassemia 1. Recently, it has been found in Laos, Thai and Cambodia using an Allele Specific-PCR technique but their epidemiological data has not been performed in Thailand. In this study, we screened Hb Pakse' in 448 unrelated Thai pregnant woman who were resided in Nakhon Si Thammarat Province. Allele Specific-PCR technique was used for the study. It was found that there were 2 (0.4%) Hb Pakse' carriers with normal Hb type (A_2A). Their hematological data were not changed as compared with those of normal subjects. This is the first report showing that Hb Pakse' was found among populations in the south of Thailand, indicating the necessity for implementation of a prevention and control program of thalassemia in this region. In addition, only these hematologic findings are not enough for the diagnosis, therefore, a PCR technique should be also used.*

Key Words : ● *Hb Pakse'* ● *Nondeletional α-thalassemia 2* ● *Hb H disease* ● *Allele Specific-PCR*

Thai J Hematol Transf Med 2008;18:43-51.