บทคัดย่อ

T 154448

ฮีโมโกลบินผิดปกติ เป็นความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ในโครงสร้างของฮีโมโกลบินที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนโกลบิน ในประเทศไทยนอกจาก Hb E และ Hb Constant Spring แล้ว ยังพบฮีโมโกลบินผิดปกติอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาความผิดปกติระดับยีน โดยการศึกษาลำดับเบสบนยีนโกลบินของฮีโมโกลบินผิดปกติที่ยังไม่ทราบชนิดในตัวอย่างเลือดคนไทย จำนวน 50 ราย พบฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนอัลฟาโกลบิน จำนวน 20 ราย ได้แก่ Hb Pakse' (α142; Term→Tyr) 10 ราย, Hb Q-Thailand (α74; Asp→His) 6 ราย, Hb Hekinan (α27; Glu→Asp) 2 ราย และ Hb Siam (α15; Gly→Arg) 2 ราย พบฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบิน จำนวน 24 ราย ได้แก่ Hb D-Punjab (β121; Glu→Gln) 10 ราย, Hb Korle-Bu (β73; Asp→Asn) 8 ราย, Hb S (β6; Glu→Val) 4 ราย และ Hb Hope (β136; Gly→Asp) 2 ราย และยังไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ จำนวน 6 ราย และได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยระดับยีนอย่างง่าย โดยวิธี PCR-RFLP สำหรับการวินิจฉัย Hb D-Punjab และ Hb Hekinan วิธี allele specific PCR (ASPCR) สำหรับการวินิจฉัย Hb Pakse', Hb Q-Thailand, Hb Siam, Hb Korle-Bu, Hb S และ Hb Hope วิธีการตรวจวินิจฉัยที่พัฒนาขึ้นได้ถูกนำไปตรวจสอบความถูกต้องในตัวอย่างเลือดจากครอบครัวผู้ป่วย พบว่าสามารถให้การวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง จากนั้นจึงได้พัฒนาเป็นชุดตรวจดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับการวินิจฉัยแยกชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อย 3 ชนิด คือ Hb Tak, Hb D-Punjab และ Hb S ด้วยวิธี multiplex ASPCR โดยเตรียมเป็นรูปของสารละลายแทนการเตรียมเป็นผงแห้ง ซึ่งพบว่าสามารถเก็บไว้ที่ -20 °C ได้นานไม่น้อยกว่า 6 เดือน และที่ 37 °C ได้นานไม่น้อยกว่า 10 วัน จากผลการประเมินจากหน่วยงานภายนอกซึ่งได้นำไปทดสอบกับตัวอย่างเลือดจำนวน 15 ราย ที่สงสัยมีฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดใดชนิดหนึ่งใน 3 ชนิด พบว่า ให้ผลถูกต้องตรงกับวิธีมาตรฐาน ผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ทราบข้อมูลชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติเพิ่มเติมอีกหลายชนิดที่ตรวจพบในคนไทย และได้วิธีการตรวจวินิจฉัยในระดับยีนอย่างง่ายสำหรับการตรวจวินิจฉัยฮีโมโกลบินผิดปกติอีกหลายชนิดทำให้สามารถให้การวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง รวมทั้งได้ชุดตรวจดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับการวินิจฉัยแยกชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการให้คำปรึกษาทางกรรมพันธุ์แก่ผู้ป่วยและครอบครัว และช่วยให้การดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคเลือดจางธาลัสซีเมียให้ดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

Abstract

TE 154448

Abnormal hemoglobins (Hb) / Hb variants are structurally inherited abnormalities of Hbs resulted from globin gene mutation. In addition to Hb E and Hb Constant Spring, many uncharacterized abnormal Hbs have been found occasionally in Thailand. In this study, molecular defects of uncharacterized abnormal Hbs from 50 Thai subjects were determined using a direct DNA sequencing technique. Of the 50 subjects, 20 were found to have α-chain variants i.e. 10 Hb Pakse' (α142; Term→Tyr), 6 Hb Q-Thailand (α74; Asp→His), 2 Hb Hekinan (α27; Glu→Asp) and 2 Hb Siam (α15; Gly→Arg). Twenty-four subjects were carriers of β-chain variants i.e. 10 Hb D-Punjab (β121; Glu→Gln), 8 Hb Korle-Bu (β73; Asp→Asn), 4 Hb S (β6; Glu→Val) and 2 Hb Hope (β136; Gly→Asp). The others are still uncharacterized. A simple and rapid direct detection of these abnormal Hbs was developed. A method based on PCR-RFLP was established for detection of Hb D-Punjab and Hb Hekinan whereas an allele specific PCR (ASPCR) methodology was used for direct detection of Hb Pakse', Hb Q-Thailand, Hb Siam, Hb Korle-Bu, Hb S and Hb Hope. Validation of the established methods in the families' members of the subjects revealed correct diagnosis. Because of a difficulty in differential diagnosis of Hb Tak, Hb D-Punjab and Hb S, a diagnostic kit based on a multiplex ASPCR for differential diagnosis of these 3 abnormal Hbs was then developed. In stead of preparing in dry form, the developed kit was prepared in solution form and kept at −20 °C and 37 °C for stability testing. The result indicated that the kit was stable for at least 6 month at -20 °C and 10 days at 37 °C. Evaluation of the kit on additional 15 blood samples suspected for these 3 abnormal Hbs by an external laboratory revealed a complete concordance with the standard methods. The basic information of abnormal Hbs obtained from the study will be helpful for genetic counseling of thalassemia and hemoglobinopathies to the patients and their families. Subsequently, the simple and rapid methods as well as the diagnostic kit developed for diagnosis of common abnormal Hbs will be useful for prevention and control program of thalassemia and hemoglobinopathies in the region.