

บทที่ 3

วิธีการวิจัย (Methodology)

3.1. การเก็บและเตรียมสิ่งส่งตรวจ

เก็บตัวอย่างเลือด (EDTA blood) ของหญิงตั้งครรภ์และสามี ที่มาเจาะเลือดเพื่อฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลกุดจับ จังหวัดอุดรธานี ตามระบบการให้บริการปกติของโรงพยาบาล ซึ่งโครงการวิจัยนี้ต้องผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากโรงพยาบาล และมีหนังสือรับรองความร่วมมือระหว่าง มรภ.สวนสุนันทา และโรงพยาบาลกุดจับ จังหวัดอุดรธานี (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) โดยตัวอย่างต้องเขียนชื่อ, สกุล, AN, HN, ward วันเวลาที่เก็บ ติดกับภาชนะให้ชัดเจน พร้อมทั้งแจ้งรายละเอียดของสิ่งส่งตรวจนั้นๆในใบ request ให้ถูกต้องตรงกันด้วย

3.2. การตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา

- การตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาโดยวิธี one tube osmotic fragility test (OFT) ทำโดยใช้ชุดตรวจ KCU-OF (PCL Holding, Thailand) ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำยาโดยใช้ตัวอย่างที่ทราบแน่นอนว่าเป็นพาหะธาลัสซีเมีย หรือ EDTA blood ที่มีค่า MCV 60-70 fl และ Hb > 12 g/dl เป็น positive control และตัวอย่างที่ทราบแน่นอนว่าปกติ หรือ EDTA blood ที่มีค่า MCV > 80 fl และ Hb > 12 g/dl เป็น negative control จากนั้นตรวจเลือด (EDTA blood) โดยหยดเลือดลงไป 20 μ l ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ก่อนอ่านผล ซึ่งการแตกของเม็ดเลือดแดงในพาหะโรคธาลัสซีเมียแอลฟาจะแตกตัวไม่สมบูรณ์ทำให้สารละลายขุ่น ถ้าในคนปกติสารละลายจะใส

- การตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาโดยวิธี immunochromatographic strip test (GPO α THAL IC strip test) หลักการคือ เลือดของผู้ป่วย หรือพาหะธาลัสซีเมียจะมีโปรตีนฮีโมโกลบินบาร์ทที่สามารถให้ผลบวกบนแถบทดสอบ โดยโปรตีนฮีโมโกลบินบาร์ทในเลือดจะซึมผ่านบริเวณดูดซับ และไปจับกับแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินบาร์ทที่ติดสีบนแถบทดสอบ เกิดเป็น antigen-antibody complex หลังจากนั้นจะซึมต่อไปและจับกับ anti Hb Bart's antibody บนแถบทดสอบ และเกิดสีขึ้น ในเลือดของผู้ป่วยที่ไม่มีโปรตีนฮีโมโกลบินบาร์ทจะไม่เกิดสีบนแถบทดสอบ อย่างไรก็ตามเพื่อบ่งบอกว่าน้ำยาและชุดทดสอบมีคุณภาพที่ดีจะต้องเกิดสีบนแถบควบคุมทุกครั้งที่ทำ การทดสอบ

ขั้นตอนการทดสอบ คือ เติมเลือด 200 μ l ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม lysis buffer 200 μ l ลงในเลือด แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex mixture) โดยตัวอย่างตรวจจะมีปริมาตรสุทธิ 400 μ l นำช่องแถบทดสอบวางไว้บริเวณอุณหภูมิห้องก่อนเปิดใช้ เมื่อนำแถบชุดทดสอบออกจากซองควรใช้ทันที จุ่มแถบชุดทดสอบลงในเลือดตัวอย่างที่เตรียมไว้โดยไม่เกินขีด maximum line ทิ้งไว้ 2-5 แล้วนำแถบชุดทดสอบมาล้างด้วย washing buffer เพื่อให้อ่านผลง่าย และควรอ่านผลภายใน 10 นาที สรุปดังรูปที่ 3.1



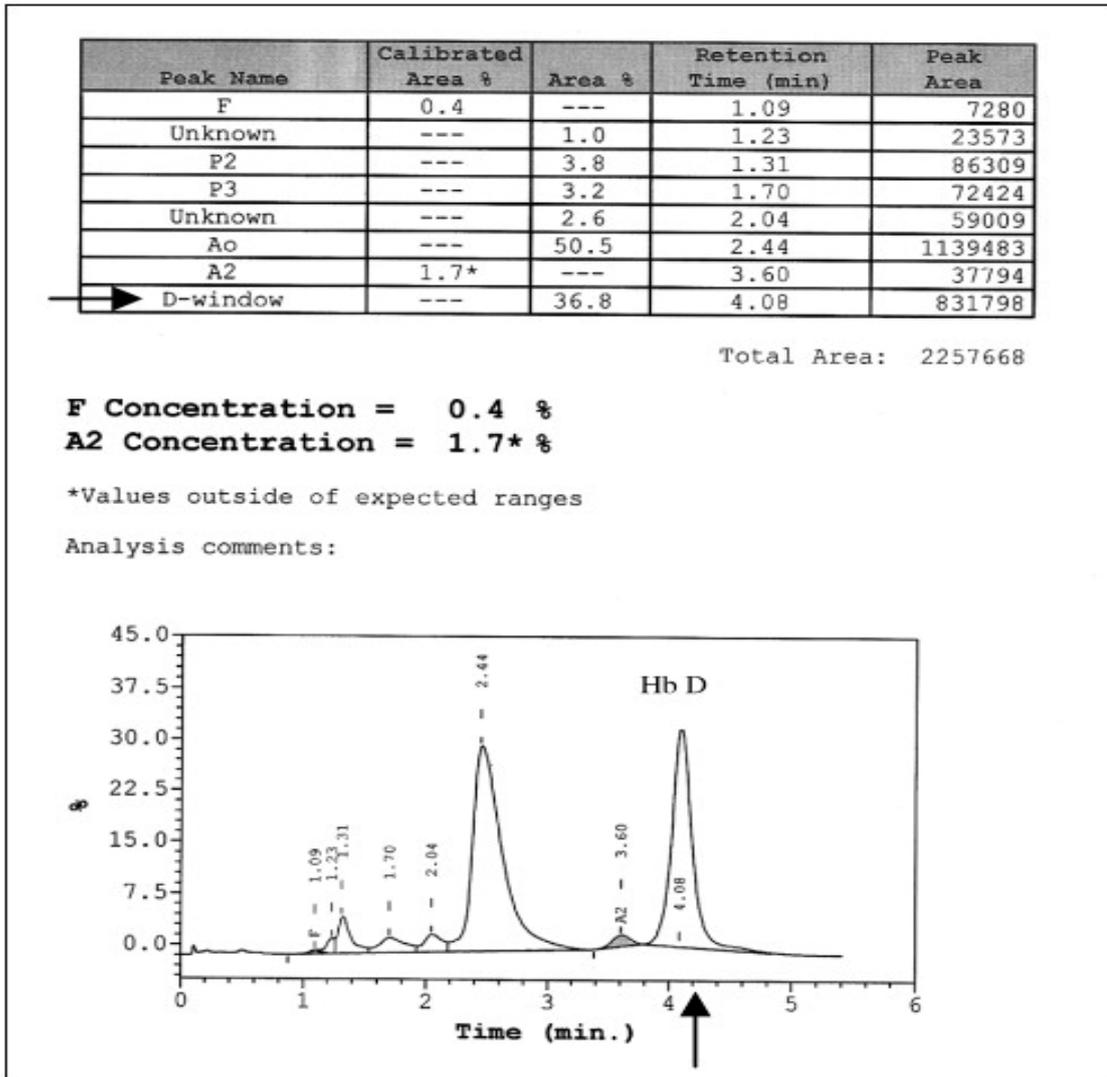
รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการตรวจโดย immunochromatographic (IC) strip test และการแปลผล

3.3. การตรวจยืนยันพยาธิสภาพธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา

3.3.1. การทดสอบ Hemoglobin typing ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ และตรวจวินิจฉัยผู้ป่วย และพาหะของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียโดยเตรียม hemolysate (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) จากนั้น นำ hemolysate ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ VARIANT™ II TURBO (BIO-RAD, USA) แสดงดังรูปที่ 3.2 ใช้หลักการวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) การแยกสารทางโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก ตัวอย่างเลือดที่ถูกเจือจางแล้ว จะถูกฉีดเข้าไปใน analytical cartridge ป้อนสองหัวในเครื่อง จะส่งบัฟเฟอร์ที่ถูกรักษาจัดการความเข้มข้นแล้วเข้าไปใน cartridge ที่ซึ่งฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ในตัวอย่างจะถูกแยกออกจากกันไหลผ่าน flow cell ของ filter photometer วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ถูกวัดผ่านกรองแสงที่ 690 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงจะถูกแปลงโดยส่วนประมวลผลและแสดงออกมาเป็น chromatogram (รูปที่ 3.3) ของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆกัน (retention time) คุณสมบัติของเครื่อง VARIANT™ II TURBO แสดงในภาคผนวก



รูปที่ 3.2 เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ VARIANT™ II TURBO (BIO-RAD, USA)



รูปที่ 3.3 ตัวอย่าง chromatogram จาก เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ VARIANT™ II TURBO

แต่อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธีนี้ไม่สามารถยืนยัน alpha-thalassemia ได้ จำเป็นต้องตรวจยืนยันด้วยการวิเคราะห์ DNA โดยเทคนิค PCR

การรายงานผลโดยใช้ค่าอ้างอิงในคน:

Hb A = 79.4 – 93.4%

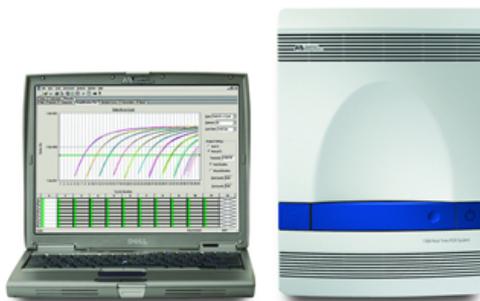
Hb A2 < 4.0%

Hb F = 0.0 – 1.2%

3.3.2. Multiplex PCR

ตรวจ α - thalassemia 1 gene ทั้ง 2 แบบ คือ ชนิด SEA deletion ที่พบได้บ่อย และ ชนิด THAI deletion ที่พบได้ไม่บ่อยนัก เพื่อป้องกันการเกิด Hb Bart's hydrops fetalis จากภาวะ homozygous α - thalassemia 1 ซึ่งตรวจพร้อมกันด้วยวิธี multiplex PCR

เริ่มจากสกัด DNA จากตัวอย่างด้วย NucleoSpin Blood kit (Mecherey-Nagel, Germany) จากนั้น เพิ่มจำนวน DNA ในตัวอย่างโดยใช้เครื่อง **Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System** (Life technologies, USA) (รูปที่ 3.4) ซึ่งควบคุมการทำงานเครื่องตามคู่มือของบริษัท (Life technologies, 2012) ส่วนการใช้ primer และ PCR condition ใช้วิธีของศูนย์ชุดทดสอบและผลิตภัณฑ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (Test Kit Center, Department of Medical Sciences, 2011) ซึ่งใช้ primer และ PCR condition นี้เหมือนกัน โดยทั่วไปสำหรับการตรวจ α - thalassemia 1 gene โดยมีรายละเอียดดังนี้



รูปที่ 3.4 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life technologies, USA)

การตรวจวินิจฉัย α - thalassemia 1 โดยเทคนิค Relative Quantitative PCR อาศัย การออกแบบ Primer และ Probe 3 ชนิด โดย Probe แต่ละชนิดได้รับการออกแบบให้ติดฉลากด้วย สารเรืองแสงที่แตกต่างกัน Probe RDP19 จำเพาะกับ Allele ของ α - Globin Gene ที่ปกติ ติด ฉลากด้วยสี FAM Probe RD3 จำเพาะ กับ Allele ที่ผิดปกติของ α - thalassemia 1 ชนิด SEA ติด ฉลากด้วยสี NED และ Probe RD6 จำเพาะกับ Allele ที่ผิดปกติของ α - thalassemia 1 ชนิดไทย ติดฉลากด้วยสี VIC สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอาศัย Primer 3 คู่ ได้แก่ Primers RD1 และ RD2 สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีความผิดปกติของ α - thalassemia 1 ชนิด SEA Primers RD4 และ RD5 สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีความผิดปกติของ α - thalassemia 1 ชนิดไทย และ Primers RD12 และ RD13 สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ของ α - Globin Gene ปกติ ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้น้ำยา TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) โดยใช้เครื่อง เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง รุ่น 7500 (Applied Biosystems, USA) เมื่อจบปฏิกิริยา เครื่องจะวัดสัญญาณแสงของสารเรืองแสงที่ติดฉลากอยู่ที่ Probe ทั้ง 3 ชนิด นำค่าที่ได้ไปคำนวณ อัตราส่วนเปรียบเทียบกับสัญญาณแสงของสี ROX ซึ่งเป็น Passive Reference Dye และรายงาน

ออกมาเป็นค่า Rn ของแต่ละ Probe การแปลผลการวิเคราะห์ทำโดยการพิจารณาค่า Cycle Threshold (Ct) ของสัญญาณสารเรืองแสงของแต่ละ Probe

DMSc α -thal 1 kit เป็นชุดน้ำยาสำหรับตรวจวินิจฉัย α -thalassemia 1 (ชนิด SEA และ ชนิดไทย) โดยเทคนิค Relative Quantitative PCR ชุดน้ำยาประกอบด้วย Primers 3 คู่ และ Probes 3 ชนิด (ความเข้มข้นอย่างละ 10 pmol/ μ L)

Primer RD1, RD2 เป็น Primer สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีความผิดปกติของ α -thalassemia 1 ชนิด SEA (SEA deletion)

Primer RD3 เป็น Probe ที่จำเพาะกับ allele ที่ผิดปกติของ α -thalassemia 1 ชนิด SEA

Primer RD4, RD5 เป็น Primer สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีความผิดปกติของ α -thalassemia 1 ชนิดไทย (Thai deletion)

Primer RD6 เป็น Probe ที่จำเพาะกับ Allele ที่ผิดปกติของ α -thalassemia 1 ชนิดไทย

Primer RD12, RD13 เป็น Primer สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ของ α -Globin gene ปกติ

Primer RDP19 เป็น Probe จำเพาะกับ Allele ของ α -Globin gene ปกติ

วิธีดำเนินการ

1. เตรียม PCR Master Mix

รายการ	ปริมาตร (μ L)
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5
Primers RD1/RD2	อย่างละ 0.4
Probe RD3	0.1
Primers RD4/RD5	อย่างละ 0.625
Probe RD6	0.1
Primers RD12 / RD13	อย่างละ 0.5
Probe RDP19	0.1
DW	1.15
DNA	8
รวม	25

2. ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Real-time PCR) โดยใช้เครื่อง Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life technologies, USA)

การแปลผลการวิเคราะห์

Negative ทั้ง SEA และ Thai Deletion: รายงานเฉพาะ Ct ของ Normal Probe เท่านั้น

Positive SEA Deletion Heterozygote: รายงาน Ct ของ Normal Probe และ Mutant SEA Probe

Positive Thai Deletion Heterozygote: รายงาน Ct ของ Normal Probe และ Mutant Thai Probe

ข้อกำหนดการแปลผล

การตรวจวินิจฉัย α - thalassemia 1 (ชนิด SEA และชนิดไทย) โดยเทคนิค Relative Quantitative PCR จะสามารถแปลผลได้ก็ต่อเมื่อ

1. Ct ของ PCR Product มีค่า ≤ 35
2. Ct ของตัวอย่าง α - thalassemia 1 heterozygous มีค่า < 5
3. มีการทำ Internal Control และผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพถูกต้อง และเป็นไป ตามข้อกำหนดข้อ 1 และ 2

ข้อควรระวัง

1. ไม่ควรใช้ Primers และ Probes ต่าง Lot
2. ควรเก็บ Probes ไว้ในที่มืด
3. วาง Primers และ Probes ไว้ที่อุณหภูมิห้องและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนใช้งาน

การเก็บ : เก็บ Primers และ Probes ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.4. การประเมินประสิทธิภาพของวิธี GPO α THAL IC strip test เปรียบเทียบกับวิธี one tube osmotic fragility test (OFT) ทำโดยใช้ชุดตรวจ KKU-OF

การประเมินประสิทธิภาพของวิธีตรวจคัดกรองทั้ง 2 วิธีทำได้โดยใช้สูตรคำนวณต่อไปนี้

- ค่าความไวของวิธี (Sensitivity of test): $\% \text{Sensitivity} = [\text{TP} / \text{TP} + \text{FN}] \times 100$
- ค่าความจำเพาะของวิธี (Specificity of test): $\% \text{Specificity} = [\text{TN} / \text{TN} + \text{FP}] \times 100$
- ค่าทำนายผลบวกหรือค่าพยากรณ์ผลบวกของวิธี (Positive predictive value, PPV): $\% \text{PPV} = [\text{TP} / \text{TP} + \text{FP}] \times 100$
- ค่าทำนายผลลบหรือค่าพยากรณ์ผลลบของวิธี (Negative predictive value, NPV): $\% \text{NPV} = [\text{TN} / \text{TN} + \text{FN}] \times 100$
- ค่าประสิทธิภาพของวิธี (Efficiency of test or accuracy): $\% \text{Efficiency} = [\text{TP} + \text{TN} / \text{TP} + \text{FP} + \text{TN} + \text{FN}] \times 100$