Thesis Title	Prevalence of Alpha-Thalassemia 1 in Pregnant Women Detected by Polymerase Chain Reaction
Author	Miss Budsakorn Kitsirisakul
Master of Science	Biochemistry

Examining committee :

Professor Torpong Sanguansermsri	Chairman
Assistant Professor Dr. Prachya Kongtawelert	Member
Dr. Heinrich F. Steger	Member
Assistant Professor Chanane Wanapirak	Member

ABSTRACT

α-thalassemia 1 is a hemolytic anemia resulting from deficient synthesis of α-globin chain. The most common form of α-thalassemia 1 in Thais is a deletion of about 20 kb of DNA (α-thalassemia 1 Southeast Asian type) in which both α-globin genes are removed. Traits ($\alpha\alpha/--^{SEA}$) are clinically normal. But homozygous α-thalassemia 1 produces a severe condition known as hemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome (--/--). A Fetus with this syndrome almost always either die *in utero* or soon after birth. Therefore, the reliable detection of this deletion is useful for the genetic counseling and prenatal diagnosis.

In the present study, hot start polymerase chain reaction (Hot Start PCR) which is the method that bringing the temperature of the template DNA and primer mix above the threshold of non-specific annealing before the first enzymatic extension by themostable polymerase was used. This technique is used to detect α-thalassemia 1 by selective amplification of the deletion break point. The amplification of the deletion break point was studied by using three primers. With primer 1 and 2, normal type DNA is detected as a 314 bp band on agarose gels. Primer 1 and 3 are used to detect the α-thalassemia 1 deletion breakpoint and give a specific 194 bp band.

The PCR method was employed to estimate the frequency of α-thalassemia 1 in the northern Thai population. Five hundred pregnant women who came for antenatal care at the Maharaj Nakorn Chiang Mai University hospital were screened in this study and the deletion was found in 44 women. The prevalence of α-thalassemia 1 from this study appears to be 8.8% and the frequency of the deletion is 0.044. The expected frequency of homozygous α-thalassemia 1 of the SEA-type is 0.00194 that means there are about two cases of hydrops fetalis per 1000 births. In addition, an erythrocyte osmotic fragility test and the quantitation of HbA_2 were explored for their usefulness for the screening for α-thalassemia 1 (SEA). Most of α-thalassemia 1 carriers have HbA_2 levels lower than 4% and all have erythrocyte osmotic fragility values lower

than 60%. Normal persons and α-thalassemia 1 carrires had significantly different erythrocyte osmotic fragility values ($p = 0.0001$).

The erythrocyte osmotic fragility test is appropriate technique to pre-screen for α-thalassemia 1 SEA-type traits in rural areas and small hospital. Whereas, the PCR method for detection of α-thalassemia 1 is too difficult for routine use. But many samples can be detected in one day. However, the PCR has to be further developed for more throughout and for use in routine diagnosis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาอุบัติการของแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ผู้หญิงตั้งครรภ์โดยวิธี โพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน
ชื่อผู้เขียน	นางสาวบุษกร กิจสิริสกุล
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ศ. นพ. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	กรรมการ
ดร. ไฮนรีก เอฟ สเตเกอร์	กรรมการ
ผศ. นพ. ชเนนทร์ วนาภิรักษ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

แอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติในการสร้างแอลฟาโปรตีน จนทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง แอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ชนิดที่พบมากในประเทศไทยเกิดจากการขาดหายไปของแอลฟาโกลบินทั้ง 2 โลกัส จะมีการขาดหายของยีนประมาณ 20 กิโลเบส (แอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ชนิด Southeast Asian type) ซึ่งโดยทั่วไปคนที่เป็นพาหะของโรคนี้ ($\alpha\alpha/--^{SEA}$) จะมีอาการปกติ แต่ถ้ามีการรวมกันของแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 จะก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่ เรียกว่า ฮีโมโกลบิน บาร์ทส์ ไฮดรอพส์ ฟีทัลลิส (--/--) ผู้ป่วยมักตายตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือตายทันทีหลังคลอด ซึ่งเป็นภาวะที่รุนแรง ดังนั้น การตรวจหาผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 จึงมีความสำคัญต่อการให้คำปรึกษาต่อคู่สมรสที่มีอัตราเสี่ยง ต่อการให้บุตรที่เป็นโรคนี้

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการตรวจหาผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 โดยทำฮอทสตาร์ทโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน วิธีการนี้เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมที่ต้องการตรวจให้มากขึ้น โดยการทำให้อุณหภูมิของสารผสมที่มีสารพันธุกรรมและไพรเมอร์อยู่สูงกว่าอุณหภูมิที่จะก่อให้เกิดผลผลิตที่ไม่ต้องการ ที่เกิดจากการรวมตัวกันเองของไพรเมอร์ แล้วจึงเติมเอนไซม์เพื่อเริ่มต้นการทำงาน ในการทดลองจะมีการใช้ไพรเมอร์ 3 ตัว ไพรเมอร์ 1 และ 2 ใช้ในการตรวจหาผู้ที่มีสารพันธุกรรมปกติ ซึ่งจะให้แถบที่จำเพาะเมื่อนำไปวิเคราะห์ในอกาโรสเจลที่ตำแหน่ง 314 เบส ในขณะที่ไพรเมอร์ 1 และ 3 จะใช้ตรวจหาผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัส ซีเมีย 1 จะให้แถบที่จำเพาะเมื่อนำไปวิเคราะห์ที่ตำแหน่ง 194 เบส

การศึกษาความชุกของผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 โดยวิธีการดังกล่าวข้างต้นในประชากรภาคเหนือ โดยทำการสุ่มตัวอย่างในคนท้องที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ 500 ราย พบว่ามีคนท้อง 44 รายที่เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 เมื่อคิดเป็นร้อยละของตัวอย่างทั้งหมด พบว่าอุบัติการของแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 คิดเป็นร้อยละ 8.8 โดยคิดเป็นความถี่เท่ากับ 0.044 ซึ่งจะส่งผลให้มีความถี่ของผู้ที่จะเป็นฮีโมโกลบินบาร์ทส์ เท่ากับ 0.00194 นั้นคือในเด็กที่จะเกิดมา 1000 คน จะมี 2 คนที่เป็นโรคนี้

นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้การตรวจสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง ในภาวะที่มีความดันภายในเม็ดเลือดสูง (Erythocyte osmotic fragility test; EOFT) ควบคู่กับการหาปริมาณฮีโมโกลบินเอทู (Hb A_2) ในการตรวจหาผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ด้วย พบว่า ผู้ที่เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ส่วนใหญ่มีปริมาณฮีโมโกลบินเอทูต่ำกว่า 4 เปอร์เซ็น นอกจากนี้ผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ทั้งหมด

ยังมีค่า EOFT ต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็น ทั้งนี้ ในผู้ปกติและผู้ที่เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 จะมีค่า EOFT แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ (P=0.0001)

วิธีการตรวจหาผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 โดยการหาค่า EOFT เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ที่สามารถนำไปใช้ตรวจกรองเบื้องต้นสำหรับหาผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ในโรงพยาบาลขนาดเล็กๆได้ ส่วนการตรวจโดยวิธทำฮอทสตาร์ทโพลีเมอเรสเชนรีแอคชันนั้น เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากแต่ให้ผลการตรวจที่มีความน่าเชื่อถือ และสามารถตรวจหาผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ได้มากรายภายในเวลาอันสั้น แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อไป ควรจะมีการพัฒนาให้สามารถใช้เทคนิคนี้ได้ง่ายขึ้น เพื่อกำหนดให้เป็นงานประจำในการตรวจหาผู้เป็นพาหะแอลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 ต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University